



FACULTAD DE MEDICINA

**INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE 25-
HIDROXIVITAMINA D EN EL
HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO, EN
PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL Y EN
PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y
DESPUÉS DE LA CIRUGÍA. IMPORTANCIA DE
REALIZAR UNA BUENA DETERMINACIÓN DE
LOS NIVELES DE ESTA VITAMINA**

TESIS DOCTORAL

ELENA LÓPEZ RAMIRO

Madrid, 2017

RESUMEN TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR D^a ELENA LÓPEZ RAMIRO

"INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE 25-HIDROXIVITAMINA D EN EL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO, EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL Y EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y DESPUÉS DE LA CIRUGÍA. IMPORTANCIA DE REALIZAR UNA BUENA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTA VITAMINA"

Introducción

La vitamina D interviene principalmente, junto con la PTH en el metabolismo del fósforo y del calcio, y por tanto en el metabolismo óseo, pero cada vez hay más estudios que demuestran su papel en otras patologías.

En la actualidad hay una alta prevalencia de niveles insuficientes de vitamina D en la población. Los pacientes con insuficiencia renal y los que presentan obesidad mórbida están especialmente afectados por este déficit de vitamina D.

Los niveles de 25-hidroxivitamina D expresan el estatus de la vitamina D en los pacientes. Hasta fecha reciente, la mayoría de las determinaciones de 25-hidroxivitamina D no estaban convenientemente estandarizadas y los valores variaban mucho de unos métodos a otros. Se ha puesto en marcha un programa de estandarización internacional, el "*vitamin D standarization program*" que ha dado lugar a la aparición de unos calibradores de referencia que están validados frente a la técnica de cromatografía líquido/tándem-masas, que es la técnica patrón oro.

Objetivos

1. Determinar el valor de 25-hidroxivitamina D por debajo del cual se produce una subida anormal de valores de PTH.
- 2.- Estudiar la influencia de los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D sobre los niveles sanguíneos de parámetros analíticos en enfermos con insuficiencia renal en estadio V (en diálisis).
- 3.- Analizar el estado de los niveles de 25-hidroxivitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía bariátrica.
- 4.- Realizar un estudio comparativo entre dos métodos de determinación de 25-hidroxivitamina D utilizados frecuentemente en los laboratorios clínicos.
- 5.- En función de los resultados obtenidos en estos estudios, valorar la importancia que tiene para la salud realizar la determinación de vitamina D en determinados pacientes y de mantener unos niveles adecuados de la misma.

Métodos

Se presentan 4 estudios, independientes, realizados en la FJD, todos relacionados con la vitamina D:

Estudio 1º: "*Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D*". Estudio descriptivo y retrospectivo, de 4.083 pacientes mayores de 18 años a los que se les hicieron simultáneamente determinaciones de PTH y 25-hidroxivitamina D y que tuvieran valores normales de calcio, filtrado

glomerular y fósforo. Se calculó el valor de 25-hidroxivitamina D para el que la PTH se elevaba por encima de 70 pg/ml con la mayor sensibilidad y especificidad.

Estudio 2º: *"Correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis"*. Se incluyeron 145 pacientes con insuficiencia renal crónica en estadio V. Se determinaron los niveles de 25-hidroxivitamina D, PTH intacta, bio PTH, hemoglobina, hematocrito, creatinina, hierro, índice de saturación de hierro, calcio, fosforo, fosfatasa alcalina total, proteína C reactiva y ferritina entre otros. Se estudió la correlación entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y estos parámetros, analizando los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p.

Estudio 3º: *"Vitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de realizarse una cirugía bariátrica"*. Análisis descriptivo y retrospectivo de 88 pacientes con obesidad mórbida operados de cirugía bariátrica entre los años 2010 y 2015, mayores de edad y con un análisis de sangre pedido antes de la cirugía y otro al año de la misma, en donde se incluyeran los niveles de 25-hidroxivitamina D y PTH.

Estudio 4º: *"Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25 (OH) vitamina D"* Se cuantificaron los niveles de 25-hidroxivitamina D en 1.000 muestras de suero del laboratorio de Bioquímica de la Fundación Jiménez Díaz mediante 2 métodos automatizados comerciales por detección de quimioluminiscencia: ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) y LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO).

Entre todas las muestras analizadas, las 50 más discordantes entre sí se enviaron para ser evaluadas por la técnica de referencia LC-MS/MS

Resultados

Primer estudio: El 74% de la población estudiada tenía una PTH en suero menor de 70 pg/ml (valores considerados normales). Al construir la curva de ROC de los niveles de 25-hidroxivitamina D, en función de valores de PTH por debajo o por encima de 70 pg/ml, el área bajo la curva fue 0,5962 ($p < 0,0001$). El punto de corte que determinó el valor de vitamina D para predecir el valor de PTH por encima de 70 pg/ml fue 24 ng/ml. De los pacientes con PTH elevada (mayor de 70 pg/ml), casi la mitad presentaban una vitamina D menor de 24 ng/ml.

Segundo estudio: Se halló una correlación significativa entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y los parámetros relacionados con el grado de anemia de los pacientes con insuficiencia renal crónica: hemoglobina $p < 0,032$, hematocrito $p < 0,051$, hierro $p < 0,003$, índice de saturación de hierro $p < 0,002$ y ferritina $p < 0,047$, así como con la creatinina $p < 0,044$, calcio $p < 0,020$, fosforo $p < 0,041$, (correlación negativa), y albumina $p < 0,041$. No se encontró correlación con ninguno de los otros parámetros analizados.

Tercer estudio: El 84% de los pacientes con obesidad mórbida presentaban valores de 25-hidroxivitamina D <24 ng/ml y de éstos 41,89% tenían la PTH >70 pg/ml. Un año después de la cirugía, hubo un incremento ($p < 0,01$) de los niveles de 25-hidroxivitamina D, probablemente porque todos los pacientes estaban tomando 25-hidroxivitamina D, pero el 50% seguían presentando niveles de 25-hidroxivitamina D <24 ng/ml y 25% continuaban con niveles de PTH >70 pg/ml. Antes de la intervención se observó una correlación entre la vitamina D y la PTH. Después de la cirugía se observó una correlación no sólo entre la vitamina D y la PTH, sino también con el hematocrito.

Cuarto estudio: Mostró que existía una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932), siendo los valores de LUMIPULSE® G1200 un 10% superiores a los de CENTAURO®. Con respecto a las 50 muestras seleccionadas, se observó que existía una buena correlación entre los dos inmunoensayos con la técnica LC-MS/MS aunque ambos métodos infravaloraban considerablemente los resultados de 25-OH vitamina D con respecto al patrón-oro.

Conclusiones

1. El valor de 25-hidroxivitamina D en nuestro estudio que maximiza especificidad y sensibilidad para elevar la PTH por encima de 70 pg/ml (límite superior de la normalidad) es 24 ng/ml.
2. En los pacientes con insuficiencia renal crónica existe una correlación entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y su grado de anemia: Hemoglobina, Hematocrito, Ferritina, etc.
3. Existe una estrecha asociación entre la obesidad mórbida y déficit de vitamina D, que se mantiene después de la cirugía bariátrica salvo que se introduzca un tratamiento adecuado de vitamina D. Asociado a este déficit de vitamina D existe un hiperparatiroidismo secundario.
4. La comparación entre los resultados de 25-hidroxivitamina D aportados por el método ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) y por el método Analizador LUMIPULSE® G1200n (FUJERIBIO) muestran que a pesar de que ambos están aceptados por el "*CDC Vitamin D Standardization Certification Program*" presentan diferencias importantes en los resultados. Es deseable una mejor estandarización de los métodos de acuerdo con los estándares del NATIONAL INSTITUT OF STANDARDS AND TECHNOLOGY.
5. A la vista de los resultados se puede establecer que el mantenimiento de unos niveles adecuados de 25 (OH) vitamina D es fundamental. Siendo importante solicitar en los análisis clínicos la determinación de 25 (OH) vitamina D, para realizar un tratamiento, si los niveles son deficientes.



FACULTAD DE MEDICINA

**INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE 25-
HIDROXIVITAMINA D EN EL
HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO, EN
PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL Y EN
PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y
DESPUÉS DE LA CIRUGÍA. IMPORTANCIA DE
REALIZAR UNA BUENA DETERMINACIÓN DE
LOS NIVELES DE ESTA VITAMINA**

Trabajo para optar al grado de Doctora en Medicina

presentado por

ELENA LÓPEZ RAMIRO

Licenciada en Medicina y Cirugía

Directores de tesis:

Dra. Mercedes Rubert

Dra. Concepción de la Piedra

Tutor de tesis: Dr. Miguel Górgolas

La **Dra. Mercedes Rubert de la Piedra** F.E.A. del Equipo de soporte hospitalario de Cuidados Paliativos del Hospital Universitario de Móstoles, la **Dra. Concha de la Piedra Gordo**, jefe asociado del laboratorio del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz y el **Dr. Miguel Górgolas Hernández-Mora**, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe Asociado del Departamento de Medicina Interna y del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

INFORMAN

Que D^a Elena López Ramiro, licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **"Influencia de los niveles de 25-hidroxivitamina D en el hiperparatiroidismo secundario, en pacientes con insuficiencia renal y en pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía. Importancia de realizar una buena determinación de los niveles de esta vitamina"**.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid a 13 de octubre de dos mil diecisiete.

Fdo. Dña Mercedes Rubert de la Piedra

Fdo. Dña Concha de la Piedra Gordo

Fdo. D Miguel Górgolas Hernández-Mora

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mi más sincero agradecimiento a la Dra. de la Piedra y a la Dra. Rubert, directoras de tesis, por su gran ayuda. Sin su paciencia, entusiasmo por la investigación y sus conocimientos en la materia esta tesis jamás se podría haber realizado. Gracias Concha por animarme en los momentos difíciles para continuar con este proyecto y a Merche por poner la guinda en el pastel.

Al Dr. Miguel Górgolas, tutor de esta tesis por su amabilidad, y constancia, que han hecho que esta tesis se haga realidad.

A todo el equipo del laboratorio de Bioquímica de la Fundación Jiménez Díaz por hacerme un hueco, en su cubículo, donde poder trabajar.

A Blanca Torrubia y a Isabel Alonso por su ayuda con la publicación de la comparación de métodos.

Al Dr. Vorwald por la cesión de la base de datos de los obesos mórbidos operados de cirugía bariátrica, y al Dr. González Parra por dejarme utilizar los datos de un estudio anterior de pacientes con insuficiencia renal.

A Ignacio Mahillo, por su importantísimo trabajo a la hora de realizar las estadísticas.

A mis padres, a mi hermana y a mi Javierico por estar ahí siempre, y más aun cuando los he necesitado. Gracias por apoyarme, ayudarme tanto y convertiros en la mejor familia que se pueda tener.

A Javi, Carol, Christian, Carmen, Naiara y Marta por los momentos compartidos durante la residencia y tras ella.

A Guille y Marta por su apoyo en la recta final de la tesis y por estar ahí al pie del cañón en momentos conflictivos.

A mis amigos de siempre, en especial a Marta, Ana, Almu, Oscar, Merche, Bea y los de Santoña, por ayudarme a crecer y evolucionar, compartiendo experiencias que me han hecho mejor a nivel tanto personal como profesional.

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz. En el cual yo, Elena López Ramiro, he trabajado como Investigadora Externa.

No ha sido financiado por ninguna entidad.

ABREVIATURAS

1,25 (OH)₂ vitamina D: 1,25-dihidroxivitamina D

1,24 D: 1,24-dihidroxivitamina D

25 (OH)D: 25-hidroxivitamina D

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATPasa: Adenosina Trifosfatasa

β-CTX: Telopéptido Carboxiterminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I

Ca: Calcio

CaBP: Proteína ligadora del Calcio (Calcium Binding Protein)

CEIC: Comité de Ética e Investigación Clínica

CCI: Coeficiente de Correlación Intraclass

CV: Coeficiente de Variación

DBP: Proteína ligadora de Vitamina D (Vitamin D Binding Protein)

DS: Desviación Estándar

FA: Fosfatasa Alcalina

FAO: Fosfatasa Alcalina Ósea

FG: Filtrado Glomerular

FGG: Factor de Crecimiento Fibroblástico (Fibroblast Growth Factor)

FJD: Fundación Jiménez Díaz

FM: Masa Grasa (Fatty Mass)

GGT: Gamma Glutamyl Transpeptidasa

Hb: Hemoglobina

IGF: Factor de Crecimiento Insulínico (Insulin Growth Factor)

IL: Interleuquina

IMC: Índice de Masa Corporal

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas en Tándem

NIST: National Institute of Standards and Technology

OMS: Organización Mundial de la Salud

P25%: Percentil 25 %

P75%: Percentil 75 %

P: Fósforo

PCR: Proteína C Reactiva

Pi: Fósforo Inorgánico

PINP: Propéptido Amino-Terminal del Colágeno Tipo I

PTH: Hormona Paratiroidea

PTHi: Hormona Paratiroidea Intacta

PTHrP: Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea (Paratohormone related-Protein)

RAAS: Sistema Renina-Angiotensina

RYGB: *Bypass* gástrico en “Y de Roux” (Roux-Y Gastric Bypass)

Sat. Transferrina: Índice de Saturación de Transferrina

SG: Gastrectomía en Manga (Sleeve Gastrectomy)

TGF β : Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming Growth Factor β)

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α (Tumor Necrosis Factor α)

TSH: Tirotropina (Hormona Estimulante del Tiroides)

UV: Ultravioleta

VDPB: Proteína Ligadora de Vitamina D (Vitamin D Binding Protein)

VDR: Receptor Nuclear de la vitamina D (Nuclear Receptor of Vitamin D)

VDSP: Programa de Estandarización de la Vitamina D

Vit: Vitamina

ÍNDICE

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Vitamina D. Síntesis y metabolitos	2
1.2. Fisiología del metabolismo fosfo-calcio. Homeostasis ósea.....	7
1.3. La vitamina D: de protagonista del metabolismo fosfo-calcico a actor fundamental en gran número de procesos fisiológicos	10
1.3.1. Funciones biológicas del sistema endocrino de la vitamina D por órganos y sistemas.....	11
1.3.2. Conclusiones sobre la influencia de la vitamina D en los procesos fisiológicos del organismo.....	17
1.4. La deficiencia de vitamina D, una autentica “plaga” para la humanidad	18
1.5. Metodos para la determinación de la 25 (OH) vitamina D, un problema de homologación.	25
1.6. Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D	26
1.7. Deficit de vitamina D asociado a insuficiencia renal	28
1.8. Obesidad y cirugía bariátrica. Cambios derivados de su realización	31
1.9. Comentarios finales a la introducción	34
2. Objetivos.....	36
3. Materiales y métodos.....	38
3.1. Aspectos éticos	39
3.2. Diseño del estudio	39
3.2.1. Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D	40
3.2.2. Correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis ...	42
3.2.3. Vitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de realizarse una cirugía bariátrica	47
3.2.4. Comparación entre dos técnicas de medida de 25 (OH) vitamina D utilizadas	

actualmente en los laboratorios clínicos	49
4. Resultados.....	53
4.1. Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D	54
4.2. Correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis.....	57
4.3. Vitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de realizarse una cirugía bariátrica.....	60
4.4. Comparación entre dos técnicas de medida de 25 (OH) vitamina D utilizadas actualmente en los laboratorios clínicos.....	64
5. Discusión	68
5.1. Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D	69
5.2. Correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis.	70
5.3. Vitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de realizarse una cirugía bariátrica.....	74
5.4. Comparación entre dos técnicas de medida de 25 (OH) vitamina D utilizadas actualmente en los laboratorios clínicos.....	79
6. Conclusiones.....	81
7. Bibliografía.....	84
8. Publicaciones a las que ha dado lugar	97

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VITAMINA D. SÍNTESIS Y METABOLITOS

La vitamina D se considera un grupo de esteroides íntimamente relacionados, que en humanos proceden de dos fuentes (1, 2, 3):

1. La piel, donde por acción de la luz ultravioleta sobre ciertas provitaminas, se obtiene la vitamina D₃ (colecalfiferol) y derivados.

2. La ingesta en forma de vitamina D₂ (ergocalciferol) de origen vegetal y la ingesta también de vitamina D₃ (colecalfiferol) procedentes de animales que lo sintetizan a través de su piel.

Vitamina D

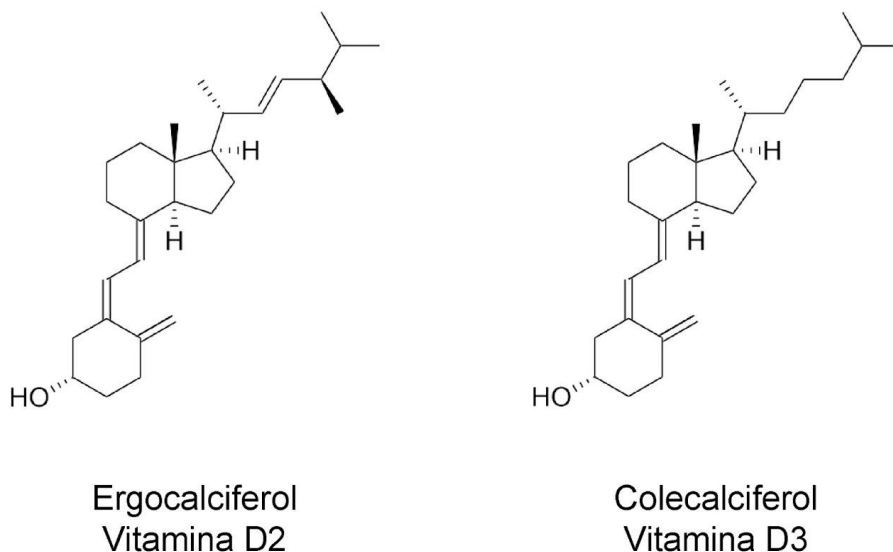


Figura 1. El ergocalciferol y el colecalfiferol se diferencian porque el ergocalciferol posee una doble unión a nivel del carbono 22,23 y un grupo metilo adicional unido al carbono 24, aunque sus 1,25-dihidroxi-metabolitos tienen una potencia biológica equivalente (1, 2, 3).

La vitamina D a pesar de su denominación como vitamina, es más bien una hormona esteroidea dada su síntesis y comportamiento. En primer lugar, su síntesis en la piel bajo la acción de la luz ultravioleta elimina su necesidad de aporte dietético, que

es lo que define a las vitaminas. Las transformaciones químicas a través de las cuales se producen los diferentes derivados de la vitamina D son del mismo tipo que las que caracterizan el metabolismo de otras hormonas esteroideas, como los glucocorticoides o los esteroides sexuales. La fina regulación de la síntesis de su metabolito activo, la 1,25-dihidroxitamina D [1,25 (OH)₂ vitamina D], también llamada calcitriol, también es similar a la que se produce en las hormonas esteroideas. La presencia de órganos diana como el intestino, riñón y hueso, que contienen receptores citosólicos de alta afinidad, específicos de la 1,25 (OH)₂ vitamina D es lo que más la caracteriza como hormona y no como vitamina (4).

Inicialmente se identificó como una vitamina por un accidente histórico. Fue descrita por primera vez en 1918 por Edward Mellanby, que realizaba estudios sobre raquitismo, y descubrió un factor presente en la dieta que prevenía la enfermedad en perros no expuestos a la luz solar. Lo denominó “vitamina soluble en grasa”.

Fue en 1922 cuando Elmer V. McCollum destruye la vitamina A del aceite de hígado de bacalao y muestra que la sustancia antirraquítica no desaparece. Nombra a la nueva sustancia "vitamina D" (5).

En los animales superiores la vitamina D se puede producir en la piel a partir de su precursor, el 7-dehidrocolesterol, abundante en la misma como un intermediario en la biosíntesis del colesterol. Por acción de luz ultravioleta, el 7-dehidrocolesterol pasa a previtamina D₃ que, por acción puramente térmica, se convierte en vitamina D₃ (Fig. 2).

La fotólisis del 7-dehidrocolesterol, que tiene lugar en la piel, aparentemente no está catalizada por enzimas o proteínas, y es idéntica a la reacción fotoquímica que tiene lugar en disolventes orgánicos. Obviamente, esta reacción no requiere la presencia de ningún componente tisular.

Debido a sus características hidrofóbicas, la vitamina D circula en sangre unida a proteínas. Actualmente se sabe que la principal proteína de transporte de la vitamina D es una α -globulina de peso molecular 52.000 Dalton, que se conoce como Proteína ligadora de vitamina D (DBP). La DBP tiene una alta afinidad de unión a la vitamina D y a sus metabolitos, siendo su constante de afinidad mayor para la 25 (OH) vitamina D (25-hidroxitamanina D) y 24,25 (OH)₂ vitamina D (24,25-dihidroxitamina D) y menor para la 1,25 (OH)₂ vitamina D (1,25-dihidroxitamina D). Esta proteína, a

diferencia de otras proteínas de transporte séricas posee alta capacidad y afinidad por sus ligandos. Debido a su elevada concentración molar, comparada con la de los metabolitos de la vitamina D, la concentración libre, tanto de la vitamina D como de sus metabolitos es pequeña. Basándose en la ley de acción de masas se ha deducido que más del 99% de todos los metabolitos de la vitamina D están ligados a la DBP.

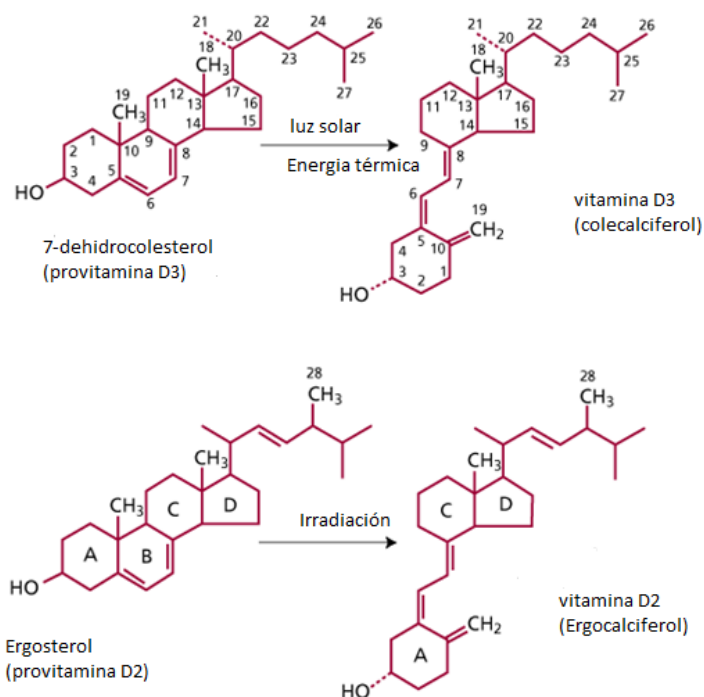


Figura 2. Conversión de provitamina D₂ y D₃ en vitamina D₂ y D₃.

Inicialmente se suponía que el hígado era el principal órgano de almacén de vitamina D. Sin embargo, actualmente está claro que el hígado no es un órgano que posea altas concentraciones de vitamina D, al menos en los animales superiores, aunque esto sea cierto en el caso de algunos pescados y en los tiburones. El principal lugar de almacenamiento de la vitamina D son los depósitos grasos y no el hígado. El aclaramiento de vitamina D del organismo depende en gran medida de la renovación de los depósitos grasos (4).

En la figura 3 se resumen las vías de síntesis y metabolismo de la vitamina D. En el hígado, la vitamina D experimenta una primera hidroxilación en posición 25 para formar la 25 (OH) vitamina D, el metabolito circulante en mayor proporción en sangre, con actividad biológica a dosis farmacológicas. La 25 (OH) vitamina D formada no se

almacena en el hígado sino que pasa a la sangre en concentraciones de 14 a 30 ng/ml y es transportada hasta el riñón ligada a la DBP. En el riñón, dependiendo de los niveles de calcio y fósforo del suero, sufre una hidroxilación en posición 1α , formándose la $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D, o bien se hidroxila en posición 24, formándose la $24,25(\text{OH})_2$ vitamina D (4).

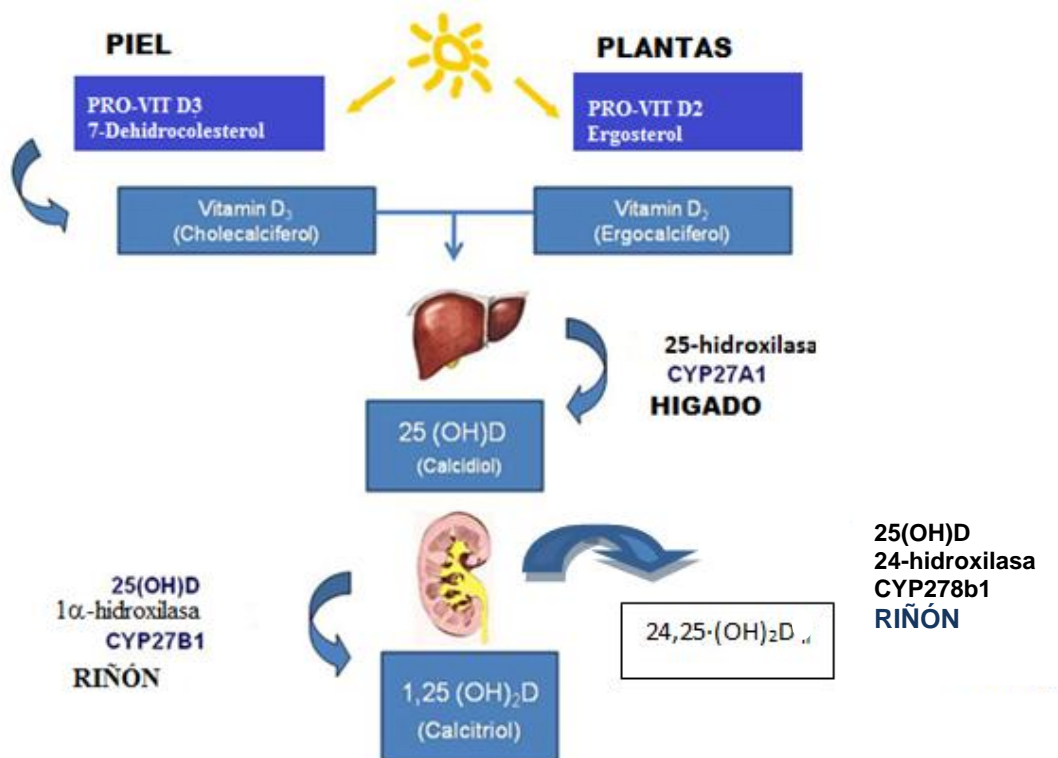


Figura 3. *Metabolismo de la vitamina D.*

La $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D es el metabolito activo de la vitamina D. Interviene de modo fundamental en la absorción intestinal de calcio y fósforo. También actúa sobre los procesos de remodelado óseo. En este sentido, existen receptores para la $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D en la célula intestinal, en el riñón y en el hueso a nivel de los osteoblastos. Hasta hace poco tiempo se pensaba que todas las acciones fisiológicas atribuidas a la vitamina D eran realizadas por este metabolito.

Aunque está ampliamente aceptado que el riñón es la principal glándula endocrina que produce la $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D, existe evidencia de que otros tejidos como el intestino, placenta y hueso pueden realizar la 1α hidroxilación (6).

Cuando las concentraciones de calcio y fósforo son normales o elevadas, la 25 (OH) vitamina D es convertida en 24,25 (OH)₂ vitamina D por inserción de un grupo hidroxilo en posición 24. Este metabolito, descubierto en 1972, es el segundo metabolito de la vitamina D más abundante en el plasma de hombres y animales (7).

La 24,25 (OH)₂ vitamina D se consideró en un principio como el primer metabolito de la ruta de degradación de la vitamina D, pero existe evidencia de que tiene actividad biológica, ya que se han descrito receptores para este metabolito en glándulas paratiroides, condrocitos y en hueso endocondral (6).

La principal regulación en la ruta metabólica de la vitamina D tiene lugar a nivel de la 1 α -hidroxilasa renal. El factor más poderoso que regula la actividad de esta enzima es la concentración de la vitamina D, o más exactamente la de la 1,25 (OH)₂ vitamina D. En caso de deficiencias de vitamina D la producción de 1,25 (OH)₂ vitamina D es máxima, mientras que la síntesis de 24,25 (OH)₂ vitamina D es menor o indetectable. Al contrario ocurriría en presencia de niveles aumentados de 1,25 (OH)₂ vitamina D.

Diversos investigadores han postulado que la estimulación de 1 α -hidroxilasa producida por bajas concentraciones de calcio está probablemente mediada por la hormona paratiroidea (PTH), la cual estimula directamente la 1 α -hidroxilasa o de modo indirecto a través de sus efectos hipofosfatémicos. En cualquier caso, la hipocalcemia y la hipofosfatemia estimulan mecanismos cuyo resultado final es elevar los niveles de 1,25 (OH)₂ vitamina D en plasma y tejidos, lo que produce como consecuencia un incremento de la absorción intestinal y por consiguiente de la concentración plasmática de calcio y fósforo (8).

La Tabla 1 muestra las concentraciones normales de los principales metabolitos de la vitamina D en suero (6).

La vitamina D, procedente del aporte exógeno o metabolizada endógenamente, se almacena en los depósitos grasos del organismo si no es requerida inmediatamente por el mismo. En condiciones fisiológicas normales, para conseguir un vaciado total de estos depósitos se necesitarían meses o años. Una vez que pasa al plasma, la vida media de la vitamina D circulante fluctúa entre 22 horas y 4,5 días, según diversos autores. El cálculo de esta vida media es complejo, ya que es dependiente de factores funcionales

del organismo en cuestión, capaces de inhibir o de activar la transformación de esta vitamina.

Algunos autores estiman la vida media de la 25 (OH) vitamina D en unos 20 días, mientras que otros dan una vida media de 31 días. Al igual que en el caso de la vitamina D, la vida media de la 25 (OH) vitamina D está influenciada por las condiciones fisiológicas de vitamina D del individuo.

La vida media de la 1,25 (OH)₂ vitamina D en sangre circulante es menor que la de sus precursores. Se ha calculado que oscila entre 1 y 5 horas. La vida media de la 24,25 (OH)₂ vitamina D se ha establecido en aproximadamente 6 horas y media (4, 6).

Tabla 1. *Concentraciones libre y total de los metabolitos de la vitamina D en suero.*

	Total	Libre	Fracción libre
25 (OH) vitamina D ₃	4x10 ⁻⁸ M	1x10 ⁻¹¹ M	0,03%
24,25 (OH) ₂ vitamina D ₃	4x10 ⁻⁹ M	1x10 ⁻¹² M	0,03%
1,25 (OH) ₂ vitamina D ₃	1x10 ⁻¹⁰ M	1x10 ⁻¹² M	1,0%

1.2. FISIOLÓGÍA DEL METABOLISMO FOSFO-CALCIO. HOMEOSTASIS ÓSEA.

Considerar que la regulación de las concentraciones de calcio y fósforo del organismo se lleva a cabo únicamente a través de las acciones de la PTH, 1,25 (OH)₂ vitamina D y calcitonina sobre el hueso, intestino y riñón es una visión incompleta. En realidad, existen muchos otros factores implicados: magnesio, pH, sodio, potasio, cloruro, bicarbonato y sulfato, capaces de alterar el manejo celular del calcio y el fósforo. Otras hormonas como la prolactina, hormonas glucocorticoideas, hormona de crecimiento, insulina, factor de crecimiento insulínico y gran número de citoquinas contribuyen a la regulación de la homeostasis mineral. Además, en la actualidad se sabe que no solo el hueso, riñón e intestino son órganos diana de las hormonas calciotropas, sino que otros tejidos también contribuyen a dicha homeostasis mineral. Sin embargo, a

la hora de presentar una visión de conjunto sobre la regulación de la homeostasis calcio/fósforo vamos a centrarnos en las hormonas clásicas [PTH, $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D, y calcitonina] y en los tres órganos diana clásicos, ya que su acción integrada es la más importante cuantitativamente frente al resto de factores.

La $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D es producida en el riñón bajo la regulación del calcio, fosfato inorgánico (Pi) y PTH. El metabolito activo de la vitamina D estimula la absorción intestinal de calcio y fósforo y, junto con la PTH, regula el remodelado óseo y la eliminación renal de calcio y fósforo.

La PTH es producida en la glándula paratiroidea bajo la regulación del calcio y de la $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D. La PTH estimula el remodelado óseo, la eliminación urinaria de fósforo y la reabsorción renal de calcio además de estimular la síntesis de $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D directamente, o a través de la hipofosfatemia que produce.

La PTH, sin embargo, no regula directamente la absorción intestinal de calcio y fósforo, pero al estimular la síntesis de $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D estimula de manera indirecta la absorción intestinal de estos dos elementos. El efecto neto de la $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D es elevar las concentraciones de calcio y de fósforo a la vez que producir un descenso de los niveles de PTH (4).

Como complemento de esta visión general, la figura 4 y 5 muestra los efectos de las hormonas calciotropas [PTH, Calcitonina y $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D] sobre los niveles séricos de calcio y fósforo a través de su acción sobre los órganos diana. La figura 6 muestra la regulación de la producción de las hormonas calciotropas por los niveles de calcio y fósforo y las concentraciones de estas propias hormonas (9).

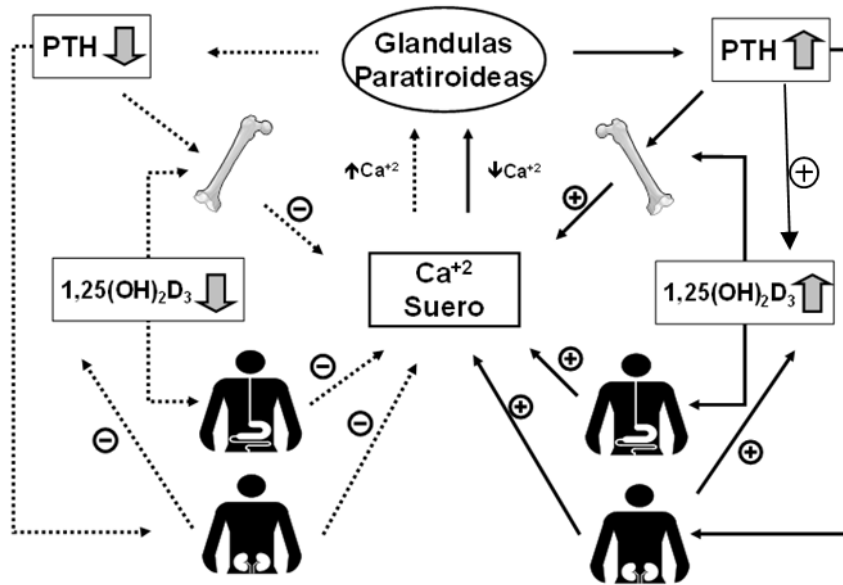


Figura 4. Regulación hormonal sobre los niveles de calcio sérico a través de su acción sobre los órganos diana.

	Hueso		Intestino		Riñón		Neto	
	Ca	Pi	Ca	Pi	Ca	Pi	Ca	Pi
PTH	↑	↑	—	—	↑	↓	↑	↓
Calcitonina	↓	↓	—	—	↓	↓	↓	↓
1,25 D	↑	↑	↑	↑	—	—	↑	↑

Figura 5. Efectos de las hormonas calciotropas PTH, calcitonina y 1,25 (OH)₂ vitamina D sobre los niveles séricos de calcio y fósforo a través de su acción en los órganos diana (4). (El símbolo “—” significa que no interviene directamente).

	Ca	Pi	PTH	1,25 D
PTH	↓	—	—	↓
Calcitonina	↑	?	?	?
1,25 D	↓	↓	↑	↓

Figura 6. Regulación de la producción y secreción de hormonas calciotropas. Las flechas indican el efecto que los agentes del eje X producen sobre la producción y secreción de las hormonas del eje Y (4).

1.3. LA VITAMINA D: DE PROTAGONISTA DEL METABOLISMO FOSFO-CÁLCICO A ACTOR FUNDAMENTAL EN GRAN NÚMERO DE PROCESOS FISIOLÓGICOS

El calcitriol, hormona principal y metabolito activo del sistema endocrino de la vitamina D se sintetiza, además de en el riñón, en muchas células, como los macrófagos activados, queratinocitos, placenta, etc., a través de 1α -hidroxilasas extra-renales. En estas células a través de mecanismos autocrinos, paracrinos o endocrinos ejerce un papel importante sobre la proliferación y diferenciación celular, regulación de la función inmune, secreción hormonal y desarrollo fetal entre otras cosas (3, 9, 10, 11).

El calcitriol es más hidrófilo y tiene menor afinidad que la 25 (OH) vitamina D por la proteína transportadora de la vitamina D, lo que facilita que en su forma libre alcance los órganos diana, donde el calcitriol produce sus efectos mediante dos mecanismos (3):

1. Regulando la transcripción génica de modo similar a otras hormonas esteroideas, a través del receptor nuclear de la vitamina D, VDR.
2. Mediante un receptor de membrana celular.

El receptor nuclear de la vitamina D (VDR) además de en los órganos diana (intestino, riñón, hueso y paratiroides) relacionados directamente con la homeostasis del calcio-fósforo, se encuentra en la práctica totalidad de células de tejidos normales y neoplásicos del organismo.

La 25 (OH) vitamina D se une aproximadamente 100 veces menos al VDR que el calcitriol (9, 12), pero como los niveles de 25 (OH) vitamina son 1000 veces mayores que la concentración de $1,25$ (OH) $_2$ vitamina D, es muy probable la activación de VDR por la 25 (OH) vitamina D. Incluso en pacientes con insuficiencia renal con muy bajos niveles de 1α -hidroxilasa renal, la suplementación con 25 (OH) vitamina D eleva la concentración de $1,25$ (OH) $_2$ vitamina D probablemente a través de las 1α -hidroxilasa extra-renales (13).

A través del VDR, el calcitriol regula la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo mineral o en procesos de diferenciación y proliferación celular, favoreciéndolos, disminuyéndolos o eliminándolos totalmente.

El principal efecto endocrino de la 1,25 (OH)₂ vitamina D en el riñón es el estrecho control de su propia homeostasis, suprimiendo la 1- α -hidroxilasa, y estimulando la 24-hidroxilasa.

La activación de VDR tiene actividad antiproliferativa, pro-diferenciadora e inmunomoduladora (9, 12), lo que puede estar relacionado con la aparición de osteoporosis, y enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas.

La VDR también contribuye a la homeostasis de la presión arterial y el volumen plasmático, la función cardíaca y la integridad de las células renales. Los efectos inmunoreguladores y antiinflamatorios del VDR pueden regular el daño renal y la aterogénesis (9, 14, 15).

Mientras que la deficiencia de vitamina D está asociada a un aumento de inflamación, reducción de factores protectores de endotelio y al estado pro-aterogénico, la sobredosis puede inducir hipercalcemia, y aumentar metaloproteínas, calcificación vascular, rigidez arterial e hipertrofia ventricular izquierda secundaria (16).

1.3.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL SISTEMA ENDOCRINO DE LA VITAMINA D POR ÓRGANOS Y SISTEMAS

A) INTESTINO

El principal papel biológico del calcitriol sobre el intestino es mantener la homeostasis fosfo-cálcica aumentando la eficiencia del intestino delgado para absorber el Calcio y el Fósforo dietético.

El Fósforo se absorbe preferentemente en el yeyuno e íleon, mientras que el Calcio se absorbe preferentemente en el duodeno.

El calcitriol aumenta la entrada de Calcio en las células absortivas del intestino, facilita el tránsito del Calcio a través del citoplasma y el paso a la circulación a través de la membrana basocelular.

Existe una respuesta rápida al calcitriol con mecanismos relacionados con la translocación del calcio a través del VDR y otra más lenta que ocurre entre doce y veinticuatro horas, implicando mecanismos genómicos, aumentando la síntesis y actividad de proteínas en intestino delgado como la proteína ligadora de calcio (CaBP),

la fosfatasa alcalina intestinal, calcio, Adenosina Trifosfatasa (ATPasa) de baja actividad, actina y otras proteínas del borde en cepillo (3).

B) HUESO

La función biológica endocrina más importante de la vitamina D sobre el hueso es su contribución a la movilización del calcio óseo en situaciones en que el calcio dietético es insuficiente para mantener los niveles de calcio sérico constante.

El calcitriol induce a las células hematopoyéticas inmaduras de la médula ósea a formar monocitos y a éstos a formas osteoclastos. Cuando los osteoclastos maduran, pierden los VDR y el calcitriol regula su acción sobre los osteoclastos indirectamente a través de los osteoblastos, que sí poseen VDR, y que inducen la resorción ósea a través de diversas citoquinas y factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β).

El calcitriol aumenta la secreción por los osteoblastos maduros de fosfatasa alcalina, osteopontina, proteína GLA de la matriz, además de citoquinas que regulan la actividad osteoclástica.

Aunque la vitamina D es habitualmente reconocida como factor determinante de la mineralización ósea, no hay evidencia de que el calcitriol participe directamente en ese proceso. El calcitriol contribuye principalmente a la mineralización de la capa osteoide manteniendo la concentración extracelular de calcio y fosfato en las concentraciones adecuadas que conducen al depósito de la hidroxapatita cálcica en la matriz ósea (3).

C) RIÑÓN

El riñón es la fuente de producción de calcitriol y/o 24,25 (OH)₂ vitamina D en función de la homeostasis calcio-fósforo. Las células tubulares renales tienen VDR, pero no está claro si el calcitriol modifica la reabsorción tubular de calcio o fósforo directamente (aunque puede ejercerlo a través de sus acciones sobre la PTH) (3, 11).

D) GLÁNDULAS PARATIROIDES

El calcitriol posee receptores en las células principales de las glándulas paratiroides, donde disminuye la síntesis y secreción de la PTH por un mecanismo de

expresión génica.

Al tiempo que disminuye la expresión de Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) de la PTH, el calcitriol aumenta la expresión de ARNm del VDR en las glándulas paratiroides, lo cual conduce a un aumento en la síntesis de VDR y de unión al calcitriol y por tanto a una amplificación del efecto inhibitor del calcitriol sobre el gen de la PTH. La disminución de Calcio sérico permite la transcripción de la PTH, al no ser esta transcripción inhibida por el calcitriol.

Estos datos tienen una transcendencia inmediata en el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario en dos situaciones: en la insuficiencia renal y en el déficit de vitamina D, más aún si se asocian con déficit dietético de calcio. En ambas circunstancias, ante el déficit de calcitriol asociado a hipocalcemia (y en la insuficiencia renal la hiperfosfatemia) se produce el incremento en las paratiroides del ARNm de PTH, pero no de ARNm de VDR. En la hiperplasia nodular paratiroidea secundaria a la insuficiencia renal existe una marcada disminución de VDR.

Además, la hipocalcemia es un estímulo mantenido de hipertrofia primero e hiperplasia glandular de las glándulas paratiroides después (3, 9, 10, 11).

E) OTRAS ACCIONES BIOLÓGICAS EN TEJIDOS NO CALCÉMICOS

****PIEL***

Los queratinocitos no sólo producen vitamina D₃ por acción de los rayos UV solares sobre el 7-dehidrocolesterol, sino que además partiendo del 25 (OH) vitamina D₃ orgánico sintetizan calcitriol y 24,25 (OH)₂ vitamina D (sin contribuir significativamente a los niveles circulantes de estos metabolitos). En los queratinocitos la PTH constituye un estímulo menor de la síntesis del calcitriol, mientras que el interferón γ y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) son los estímulos principales para su síntesis. El calcitriol inhibe su propia síntesis y estimula la síntesis de 24,25 (OH)₂ vitamina D.

El calcitriol actúa en el VDR presente en los queratinocitos y a través de él induce la diferenciación celular e inhibe su proliferación a concentraciones más altas que las normalmente circundantes, mediante un mecanismo de acción autocrino/paracrino.

Además, el calcio y el calcitriol interactúan en la inhibición de la proliferación y en la estimulación de los genes diferenciadores de queratinocitos. El calcitriol aumenta la expresión de la proteína receptora de calcio de modo que, cuanto más alto es el calcio, más potente es el efecto diferenciador y antiproliferativo del calcitriol, y viceversa (3, 9, 10, 11).

** CÁNCER*

Estudios epidemiológicos han sugerido que el déficit de vitamina D (y de calcio) puede aumentar el riesgo de algunos tipos de tumores, como el de colon, próstata y mama, entre otros.

El calcitriol, como sucede en otros tejidos, disminuye la proliferación celular aumentando la diferenciación celular. Estimula la expresión de su propio receptor (VDR) e inhibe determinados factores de crecimiento como IGFs (Factor de Crecimiento Insulínico), TGFb, PTHrP (Proteína relacionada con la hormona paratiroidea) y diversos oncogenes, además de activar determinados genes supresores (3, 9, 10, 11).

** ACCIONES HEMATOLÓGICAS: INMUNOSUPRESIÓN Y AUTOINMUNIDAD*

Los VDR se expresan también en la mayoría de las células del sistema inmune, incluido macrófagos, células dentríticas, y linfocitos T CD4+ y CD8+.

La 1 α -hidroxilasa presente en macrófagos, células dentríticas y queratinocitos de la piel es estimulada por citoquinas, pero no por PTH, y no es inhibida por calcitriol (9, 17).

En desórdenes inflamatorios/granulomatosos, la 1 α -hidroxilasa presente en macrófagos no es suprimida por el exceso de calcitriol en la circulación. De todas formas, en la enfermedad renal, la 1 α -hidroxilasa de los monocitos de la sangre periférica es exquisitamente sensible al *feedback* de la inhibición producida por la concentración fisiológica de 1,25 (OH)₂ vitamina D sérica. La activación de VDR inhibe las células Th1, promueve el desarrollo de células Th2, y modula la función de macrófagos y células dentríticas, favoreciendo la auto-tolerancia y la inducción de la regulación de las células T CD4+ y CD25+ (9, 18, 19).

En determinados procesos, como la sarcoidosis y otras enfermedades granulomatosas como la tuberculosis, beriliosis, etc., el estímulo a los monocitos/macrófagos de los granulomas por el interferón gamma e interleuquina 2 (IL2) para formar calcitriol es la causa de la hipercalcemia e hipercalciuria características de estas enfermedades. Un mecanismo similar resulta en la hipercalcemia en pacientes con determinados linfomas Hodgkin y no Hodgkin de baja actividad. Pero los macrófagos además de sintetizar el calcitriol, poseen VDR y son diana del mismo, aumentando la actividad antimicrobiana, citotóxica, la quimiotaxis, la capacidad fagocítica bacteriana y la capacidad de reconocer bacterias, tanto “in vitro” como “ex vivo”. La modulación de la citotoxicidad producida por el calcitriol resulta complementada por sus efectos sobre la presentación antigénica (función accesoria) (1, 3, 9, 17).

Por otra parte, el calcitriol estimula la diferenciación de los precursores de macrófagos y monocitos e inhibe la proliferación y estimula la diferenciación de células mielomonocíticas.

El calcitriol estimula la proliferación de linfocitos, estimulando la expresión de interleuquina (IL-1) por monocitos macrófagos. La IL-1 es un estimulador importante de la activación celular de G0 a G1. Esto indica que el calcitriol estimula las primeras fases de la proliferación celular de los linfocitos T.

La diana funcional principal del calcitriol son los linfocitos T “helper” (Th). Evita su proliferación al inhibir la secreción de interleuquina 2, interferón gamma, y TNF α por los linfocitos. Mejorando así mismo la disponibilidad de los linfocitos T supresores, y activando la interleuquina 1 por los monocitos macrófagos.

El calcitriol inhibe la proliferación de linfocitos B y la producción de IgG probablemente mediado por la acción sobre los linfocitos Th. Estas acciones en conjunto disminuyen la actividad Th1 y aumentan la actividad Th2.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el subgrupo Th1 en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (diabetes tipo I, Lupus Eritematoso Sistémico, artritis, etc.), el calcitriol (generado a partir de calcidiol) puede considerarse importante agente inmunomodulador (3, 9, 10, 11).

** PANCREAS*

Las células beta pancreáticas, que poseen también VDR, son un importante órgano diana del calcitriol, donde puede estimular la secreción de insulina; el déficit severo de vitamina D puede condicionar una alteración en la tolerancia a la glucosa y secreción de insulina (3, 9, 10, 11, 20).

** SISTEMA CARDIOVASCULAR*

En el músculo estriado del corazón, el calcitriol inhibe la proliferación celular y la apoptosis y favorece la formación de miocitos cardíacos. En las células mesenquimales pluripotenciales el calcitriol activa el VDR y aumenta los factores fibrinolíticos, pudiendo revertir así la hipertrofia ventricular izquierda y mejorando la supervivencia. El factor atrial natriurético producido por miocitos auriculares es inhibido por el calcitriol independientemente de los niveles de calcio, favoreciendo así un buen control de la tensión arterial. El mecanismo potencial involucrado en la protección cardiovascular por el calcitriol incluye: anti-inflamación, anti-aterogénesis, inhibición de la hipertrofia cardíaca, proliferación de miocitos, y regulación del sistema renina angiotensina (RAAS) con la preservación de la función renal (3, 9, 10, 11).

** OTROS ÓRGANOS DIANA*

La hipófisis presenta VDR, sobre todo en células productoras de TSH, donde estimula su secreción.

En las células parafoliculares tiroideas (células C), el calcitriol regula la secreción de calcitonina.

No se ha descrito una función fisiológica clara a la presencia de VDR en las glándulas suprarrenales.

En las células de Sertoli testiculares los VDR aumentan con la maduración y estímulo, con alteración de la espermatogénesis en situaciones de déficit severo de vitamina D (3).

El calcitriol puede jugar un interesante papel en el desarrollo y maduración pulmonar fetal.

En el hígado y en el sistema nervioso central también existen VDR, donde el calcitriol ejerce funciones sobre actividad enzimática e induce el factor de crecimiento neurológico, lo que le confiere potencialidad en enfermedades degenerativas tipo Alzheimer (3).

En el músculo esquelético el calcitriol ejerce acciones génicas y sobre el VDR, regula la proliferación de mioblastos, el movimiento de calcio intracelular, etc., de tal modo que en déficits severos de vitamina D, como sucede en la osteomalacia, se produce una miopatía preferentemente proximal, con alteraciones morfológicas del retículo sarcoplásmico, y de la concentración de troponina C, disminución de ATP o producción de creatina fosfato. Estas alteraciones bioquímicas y funcionales responden al tratamiento con vitamina D (lo mismo ocurre con el músculo estriado del corazón) (3, 9, 10, 11).

Además de las importantes acciones endocrinas de la vitamina D sobre el hueso y el metabolismo mineral (donde el déficit de vitamina D está perfectamente documentado que produce osteoporosis y osteomalacia), sus acciones sobre el crecimiento y diferenciación celular, secreción endocrina, regulación inmunológica, respuesta antimicrobiana, regulación de la apoptosis, diferenciación epidérmica etc., asociado a los datos de que en áreas geográficas con bajos niveles de vitamina D se produce mayor incidencia en enfermedades autoinmunes e hiperproliferativas (3, 9, 10, 11), hacen que conseguir niveles séricos adecuados de 25 (OH) vitamina D₃ (sustrato para la síntesis de calcitriol) deba ser un objetivo irrenunciable de la Sanidad Pública (21).

Otro importante objetivo es el desarrollo de análogos de calcitriol con actividad específica antiproliferativa/diferenciadora o reguladora de la inmunidad, sin actividad hipercalcemiante (22), o su empleo en asociación con agentes que potencien su acción biológica.

1.3.2. CONCLUSIONES SOBRE LA INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS DEL ORGANISMO

El déficit de vitamina D, definido como niveles séricos de 25 (OH) vitamina D < 20 ng/ml, es una condición muy común en la población general y en enfermedades inflamatorias crónicas, como la insuficiencia renal, que favorece el desarrollo de

enfermedades metabólicas óseas. Evidencias clínicas y experimentales recientes sugieren fuertemente que el déficit de vitamina D es un nuevo factor de riesgo para la progresión de la enfermedad renal y cardiovascular. Esta relación es más evidente en pacientes con insuficiencia renal. En estos pacientes, la terapia nutricional con vitamina D, calcitriol y/o activadores de VDR, mejora los resultados cardiovasculares y su supervivencia.

Como se ha expuesto anteriormente, la expresión generalizada de VDR en muchos órganos y sistemas constituye la base biológica para las acciones no esqueléticas y pleiotrópicas de la vitamina D.

Por todo ello, conseguir niveles séricos adecuados de 25 (OH) vitamina D (sustrato para la síntesis de calcitriol) debería ser un objetivo imprescindible de la Sanidad Pública (21).

1.4. LA DEFICIENCIA DE VITAMINA D, UNA AUTÉNTICA “PLAGA” PARA LA HUMANIDAD

En los últimos años ha habido muchos estudios que sugieren una alta prevalencia de estados subóptimos y deficiencia de vitamina D en Europa. Además los niveles de vitamina D son especialmente bajos en subgrupos de poblaciones, tales como personas institucionalizadas, ancianos, e inmigrantes.

Existe una gran diferencia de los estados de vitamina D entre diferentes países dada la diferencia entre los métodos usados, la latitud de los países, el color de la piel y factores involucrados en el estilo de vida como el consumo de alimentos ricos en vitamina D o el uso estandarizado en determinados países (como Finlandia) de suplementos de vitamina D, o la exposición solar por el tipo de trabajo u ocio (23).

La definición de un estado de vitamina D adecuado u óptimo es clave para determinar las recomendaciones para una ingesta de vitamina D en la población general, lo que permitirá mantener el estado satisfactorio durante todo el año, incluidos los meses de invierno.

Existe una gran dispersión en los datos sobre la prevalencia de deficiencia de vitamina D en la población europea en todas las edades. Una de las explicaciones de esa

variación es el distinto método de medición empleado. Además existe controversia a la hora definir cuáles son los niveles séricos óptimos de vitamina D en la población general.

Aunque la 1,25 (OH)₂ vitamina D es la forma biológica más activa de la vitamina D, tiene una vida media muy corta. La 25 (OH) vitamina D es el metabolito de la vitamina D más abundante, y responde por los depósitos. Está ampliamente aceptado que la 25 (OH) vitamina D es el mejor indicador del estado de la vitamina D, tiene una vida media más larga y numerosos estudios han demostrado la asociación inversa de la concentración de 25 (OH) vitamina D con la evolución de muchas enfermedades. Además dado que la deficiencia de vitamina D genera elevación de la PTH, y ésta última produce un aumento de la acción de la 1 α -hidroxilasa que promueve la conversión de 25 (OH) vitamina D a 1,25 (OH)₂ vitamina D, puede haber niveles normales de 1,25 (OH)₂ vitamina D con deficiencia de vitamina D (11, 24).

Durante muchos años la deficiencia de vitamina D fue definida como la concentración de 25 (OH) vitamina D asociada a raquitismo (< 8-20 ng/ml). Posteriormente se enfocó de manera diferente (11, 25), puesto que se basó en la relación inversamente proporcional que existe entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y las concentraciones séricas de PTH. Es decir, los niveles de 25 (OH) vitamina D son inadecuados cuando se acompañan de elevación compensatoria de la PTH.

Aunque existen diferentes puntos de corte sobre los niveles séricos de 25 (OH) vitamina D, la mayoría de los autores coinciden en que valores inferiores a 10 ng/ml corresponden a déficit severo (capaz de producir raquitismo y osteomalacia), niveles inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l) corresponden a deficiencia. Los niveles entre 20 y 30 ng/ml (50 a 75 nmol/l) se consideran insuficiencia, y los niveles óptimos son aquellos que están por encima de 30 ng/ml (75 nmol/l). Las concentraciones de 25 (OH) vitamina D se relacionan de manera inversa con los niveles de PTH, de tal manera que cuando alcanzan valores de 30 a 40 ng/ml, la PTH comienza a descender hasta llegar a valores mínimos. Adicionalmente, el transporte de calcio intestinal se incrementa en 45% a 65% cuando se incrementan los niveles desde 20 ng/ml hasta 32 ng/ml. Por lo tanto, se considera que los niveles de insuficiencia van de 20 a 30 ng/ml y los adecuados son aquellos mayores a 30 ng/ml hasta los límites de intoxicación, que se consideran por encima de 150 ng/ml (11, 26).

Es importante tener en consideración que los términos de “deficiencia” o “insuficiencia” no necesariamente connotan una enfermedad clínicamente manifiesta, como ocurre por ejemplo con la deficiencia de la vitamina C que produce escorbuto. De todas formas, en el caso de la vitamina D, estos estados de deficiencia e insuficiencia implican un riesgo mayor de ciertas patologías a largo plazo.

En la Tabla 2 se definen los estados de la vitamina D basados en los niveles serológicos de 25 (OH) vitamina D (11).

En la figura 7 y en la tabla 3 se presentan las múltiples causas y consecuencias de la deficiencia de vitamina D.

Tabla 2. *Definiciones del estatus de vitamina D según los niveles de 25 (OH) vitamina D (11).*

Estatus de vitamina D	Niveles de 25-hidroxi-vitamina D₃	Asociación clínica y bioquímica
Deficiencia severa	0-10 ng/mL*	Raquitismo, osteomalacia, hiperparatiroidismo severo, mala-absorción de calcio
Deficiencia	10-20 ng/mL	PTH elevada, absorción intestinal de calcio reducida, densidad mineral ósea reducida
Insuficiencia	20-30 ng/mL	Niveles bajos de 25-hidroxivitamina D ₃ , ligero aumento de PTH
Adecuado	40-80 ng/mL	Ningún disturbio en las funciones dependientes de vitamina D
Tóxico	> 150 ng/mL	Hipercalcemia

* Para convertir ng/mL a nmol/L, se debe multiplicar por 2,5

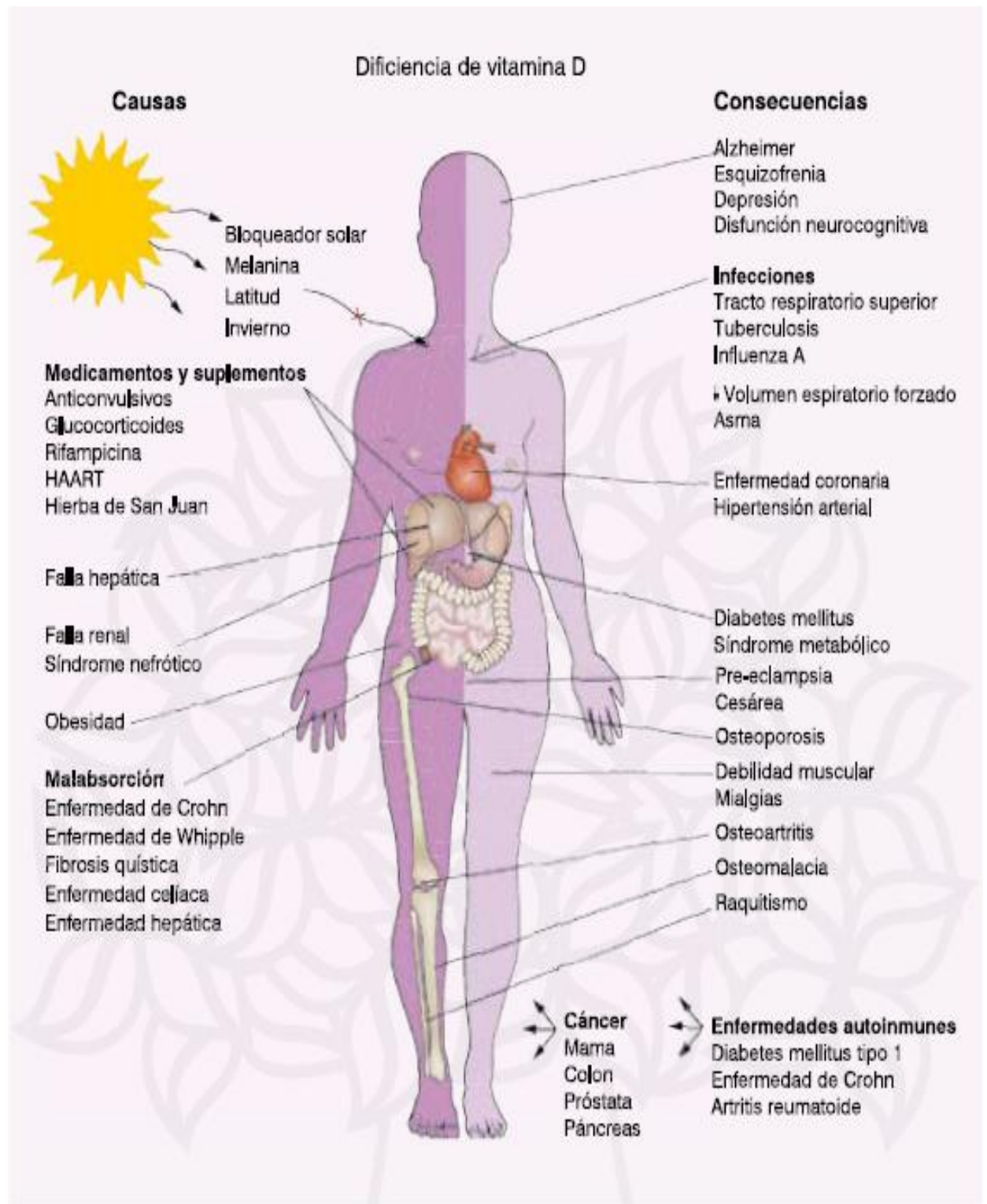


Figura 7. Principales causas de la deficiencia de vitamina D y consecuencias potenciales en el estado de salud. Tomado y modificado de Holick MF. Vitamin D deficiency 2010: health benefits of vitamina D and sunlight: a D-base, Nat Rev Endocrinol 2011; 7: 73-75 (11).

Tabla 3.I. Causas de la deficiencia de la vitamina D (11).

Causa	Efecto
Reducción de síntesis de vitamina D₃ en la piel	
Uso de pantallas solares: interferencia con la absorción de los rayos UVB	Reduce la síntesis de vitamina D ₃ (FPS 8 en 92,5%; FPS 15 en 98-99%)
Pigmentación de la piel: absorción de la radiación UVB por la melanina	<ul style="list-style-type: none">■ Reduce la síntesis de vitamina D₃ hasta en 99%■ Las personas con tipo de piel 5/6 (piel oscura) requieren 10 veces más exposición solar para producir las mismas cantidades de vitamina D₃ que las personas blancas con piel tipo 2/3
Edad: reducción del 7-dehidrocolesterol en la piel	Reduce progresivamente la síntesis de vitamina D ₃ hasta en 75% a los 70 años
Estación, latitud y hora del día: el número de fotones de UVB que alcanzan la Tierra depende del ángulo en el cenit de los rayos solares (mientras más oblicuos, menos fotones llegan)	<ul style="list-style-type: none">■ A mayor latitud (>35°) los rayos solares llegan más oblicuos y tienen que atravesar una mayor capa de ozono, y por ende llegarían con menor disponibilidad■ En los meses de invierno, para las zonas por encima de 37° latitud norte, los fotones UVB que alcanzan la atmósfera disminuyen hasta en 80%■ La exposición más óptima a los fotones UVB se presenta entre las 10:00 a.m. y las 3:00 p.m.
Disminución de la biodisponibilidad	
Mala-absorción: reducción de la absorción de la grasa (fibrosis quística, enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, enfermedad de Crohn, bypass gástrico o uso de medicamentos que reducen la absorción del colesterol)	Deterioro de la capacidad corporal para absorber la vitamina D
Obesidad: secuestro de la vitamina D en la grasa corporal	Reduce la biodisponibilidad de la vitamina D
Incremento del catabolismo	
Anticonvulsivantes, glucocorticoides, terapia HAART	Activan la degradación de la 25-hidroxivitamina D ₃ y la 1,25-dihidroxivitamina D ₃ por conversión a su forma inactiva que es el ácido calcitroico
Lactancia materna	
Contenido pobre de vitamina D en la leche humana, Empeora si la madre tiene deficiencia de vitamina D	Incrementa el riesgo en niños alimentados exclusivamente con leche materna (predominantemente si son hijos de madres deficientes y si tienen piel oscura)
Disminución de la síntesis de 25-hidroxivitamina D₃ por falla hepática	
Disfunción leve a moderada	Causa mala-absorción de la vitamina D, pero la producción de 25-hidroxivitamina D ₃ es posible
Disfunción del 90% o más	Incapacidad para producir suficiente 25-hidroxivitamina D ₃
Pérdida urinaria de 25-hidroxivitamina D₃ incrementada	
Síndrome nefrótico: pérdida de la 25-hidroxivitamina D ₃ unida a la DBP por la orina	Pérdida sustancial de 25-hidroxivitamina D ₃
Disminución de la síntesis de 1,25-dihidroxivitamina D₃ por enfermedad renal crónica	
Estadíos 2 y 3	Causa disminución de la excreción fraccional de fósforo y disminución de los niveles séricos de 1,25-dihidroxivitamina D ₃
La hiperfosfatemia incrementa el FGF-23, el cual disminuye la actividad de la 1α-hidroxilasa	
Estadíos 4 y 5	Causa hipocalcemia, hiperparatiroidismo secundario y enfermedad ósea de origen renal
Incapacidad para producir cantidades adecuadas de 1,25-dihidroxivitamina D ₃	
Causas hereditarias de raquitismo	
Raquitismo por pseudodeficiencia de vitamina D (raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1): por mutaciones en el gen de la enzima 1α-hidroxilasa	Generan reducción o ausencia de síntesis de 1,25-dihidroxivitamina D ₃
Raquitismo resistente a vitamina D (raquitismo dependiente de vitamina D tipo 2): por mutaciones en el gen del receptor de la vitamina D	Producen resistencia parcial o completa a la 1,25-dihidroxivitamina D ₃ , resultando en niveles elevados de este metabolito
Raquitismo dependiente de vitamina D tipo 3: por sobreproducción de proteínas de unión a los elementos de respuesta a hormona	Impide la acción de la 1,25-dihidroxivitamina D ₃ en el control de la transcripción, causando resistencia en las células blanco y niveles elevados de 1,25-dihidroxivitamina D ₃

Tabla 3.II. Causas de la deficiencia de la vitamina D (11).

Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante: por mutaciones en el gen del FGF-23 que evitan o reducen su fragmentación.	Causan fosfaturia, disminución de la absorción intestinal del fósforo, hipofosfatemia y disminución de la actividad de la 1 α -hidroxilasa, resultando en niveles bajos-normales de calcio y niveles bajos de 1,25-dihidroxitamina D ₃ .
Raquitismo hipofosfatémico ligado al X: por mutaciones del gen PHEX que producen niveles elevados de FGF-23	Causan fosfaturia, disminución de la absorción intestinal del fósforo, hipofosfatemia y disminución de la actividad de la 1 α -hidroxilasa, resultando en niveles bajos-normales de calcio y niveles bajos de 1,25-dihidroxitamina D ₃ .
Trastornos adquiridos	
Osteomalacia inducida por tumor: secreción tumoral de FGF-23 y posiblemente de otras fosfatonas	Causa fosfaturia, disminución de la absorción intestinal del fósforo, hipofosfatemia y disminución de la actividad de la 1 α -hidroxilasa, resultando en niveles bajos-normales de calcio y niveles bajos de 1,25-dihidroxitamina D ₃ .
Hiperparatiroidismo primario: incrementa los niveles de PTH, causando aumento del metabolismo de la 25-hidroxitamina D ₃ a 1,25-dihidroxitamina D ₃ .	Disminuye los niveles de 25-hidroxitamina D ₃ e incrementa los niveles de 1,25-dihidroxitamina D ₃ , que pueden estar normales-altos o elevados.
Enfermedades granulomatosas, sarcoidosis, tuberculosis, y otras condiciones, incluyendo algunos linfomas: por conversión de 25-hidroxitamina D ₃ a 1,25-dihidroxitamina D ₃ por parte de los macrófagos	Disminución de los niveles de 25-hidroxitamina D ₃ e incremento de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D ₃ .
Hipertiroidismo: aumenta el metabolismo de la 25-hidroxitamina D ₃ .	Reduce los niveles de 25-hidroxitamina D ₃ .
Convenciones: UVB: rayos ultravioleta B; FPS: factor de protección solar; HAART: terapia antirretroviral de gran actividad; FGF-23: factor de crecimiento fibroblástico-23.	

En Europa se han descrito niveles por debajo de 25 ng/ml hasta en un 2-30% de los adultos, incrementándose este porcentaje en los ancianos y personas institucionalizadas hasta un 80% en algunos estudios (27). Se tienen estimaciones de que hasta el 30% -50% de los niños y adultos de Estados Unidos, Canadá, México, Europa y Australia son deficientes en vitamina D (11). En Estados Unidos, en adultos, hay una prevalencia global de 41,6% de deficiencia de vitamina D, que es mayor en personas de raza negra e hispanos. En niños se encontró una prevalencia del 9% de deficiencia y 61% de insuficiencia (23).

Europa y especialmente los países mediterráneos, tienen mucha exposición solar, en comparación con los países del Norte. El período de verano da a la gente la capacidad de absorber cantidades adecuadas de vitamina D. A pesar de que el sol es adecuado en estos países, la insuficiencia de vitamina D es un problema de salud global común (28).

En 2012 se comenzó un estudio realizado por DSM (Decision Support in Medicine) en cooperación con IOF (Fundación Internacional de Osteoporosis) que dio lugar a una representación de los niveles de 25 (OH) vitamina D en Europa. Como

podemos ver en el mapa siguiente, los niveles de 25 (OH) vitamina D con color amarillo, para la población general están entre 50 y 75 nmol/l. Estos países son Francia, Reino Unido, Córcega, España y Noruega. Por otro lado, hay muchos países como Suiza, Alemania, Estonia y Finlandia donde los niveles de 25 (OH) vitamina D son insuficientes (Figura 8) (28).

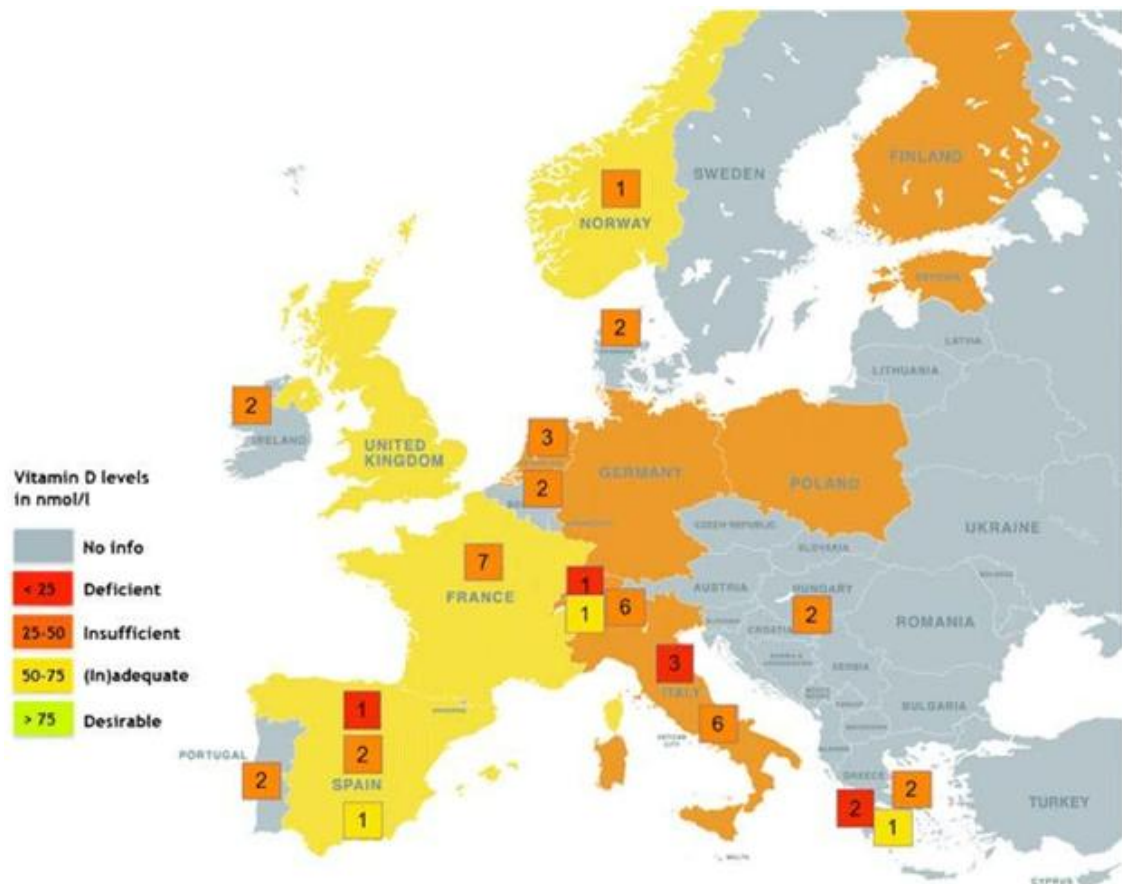


Figura 8. Clasificación global de la vitamina D.

En la figura 9 vemos el estado de los niveles de vitamina D en mayores de 18 años a nivel mundial en el año 2011 (29).

La deficiencia de vitamina D, a mayor escala, puede ser un problema de salud pública. Por esta razón, los gobiernos deben prestar atención a esta cuestión y proporcionar soluciones a sus ciudadanos. Una campaña que promueva la conciencia de la población sobre la importancia de la vitamina D sería un buen punto de partida.

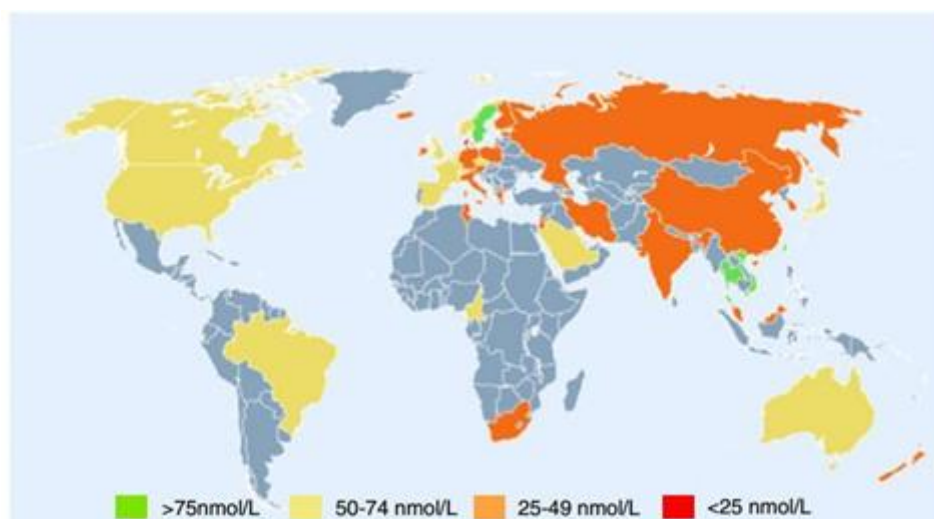


Figura 9. Estado de la vitamina D en adultos (> 18 años) en el mundo cuando los datos están disponibles. Los valores en invierno fueron usados para calcular los niveles medios de 25 (OH) vitamina D.

1.5. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA 25 (OH) VITAMINA D, UN PROBLEMA DE HOMOLOGACIÓN

La cuantificación de 25 (OH) vitamina D total en sangre, como ya se ha dicho anteriormente, es el marcador más preciso del estado de vitamina D en un individuo, aunque su metabolito activo es la 1,25 (OH)₂ vitamina D (30, 31).

La técnica patrón-oro para su medición es la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), pero actualmente los laboratorios clínicos utilizan de rutina inmunoensayos por quimioluminiscencia (32).

Los principales problemas de dichos inmunoensayos se deben a la naturaleza hidrofóbica del analito, la alta concentración en la que se encuentra la proteína ligadora de vitamina D (VDPB) en el suero, y la existencia de reacciones cruzadas de los múltiples metabolitos de vitamina D con los anticuerpos utilizados en la técnica. Por ello, un correcto inmunoensayo requiere un pretratamiento para inactivar la VDPB, una selección cuidadosa del anticuerpo utilizado y la estandarización de la técnica frente a los valores arrojados por el analizador LC-MS/MS.

Las diferentes técnicas comerciales para el análisis de vitamina D difieren en la manera de separar la proteína ligadora, en el porcentaje de reacciones cruzadas con otros metabolitos del analito en cuestión y en la especificidad del anticuerpo utilizado (31, 33). Actualmente, como resultado del conocimiento general sobre la severa

deficiencia de vitamina D en la población mundial, ha surgido la necesidad de medir los niveles de vitamina D en diferentes poblaciones, cohortes de investigación y pacientes individuales (34). Diversos estudios han mostrado variaciones considerables entre los diversos métodos analíticos basados en inmunoquímica, cromatografía líquida/UV y LC-MS/MS. Se ha llegado a afirmar que un paciente concreto puede ser clasificado con niveles de suficiencia o insuficiencia de vitamina D dependiendo del laboratorio donde se haya realizado el análisis (34, 35).

Para solucionar este problema se ha establecido la necesidad de estandarización de los niveles de 25 (OH) vitamina D por parte de numerosas organizaciones científicas. En 2011, la Oficina de Suplementos Dietéticos (ODS) del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH) en colaboración con el National Institute of Standards and Technology (NIST) creó el programa de estandarización de la vitamina D (VDSP). El NIST ha desarrollado 4 materiales de referencia basados en suero con diferentes concentraciones conocidas de vitamina D que permiten estandarizar las diversas técnicas comerciales (34, 36). A pesar de ello, no todos los métodos actuales empleados para cuantificar 25 (OH) vitamina D están ya calibrados frente a estos estándares (37).

1.6. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D

La PTH es una hormona secretada en la glándula paratiroides, que interviene en el metabolismo del calcio, sacándolo del hueso si hay hipocalcemia, y aumentando la producción de 1,25 (OH)₂ vitamina D en el riñón, para favorecer la absorción del calcio. Al mismo tiempo este metabolito, al elevar los niveles de calcio, en sangre inhibe indirectamente la producción de PTH.

La PTH junto con la vitamina D son las hormonas más importantes en el metabolismo óseo y del calcio-fósforo. Se ha comprobado en diferentes estudios que los niveles de PTH y vitamina D en sangre están prácticamente siempre correlacionados.

El hiperparatiroidismo es un exceso de hormona paratiroidea en la sangre debido a la hiperactividad de una o más de las cuatro glándulas paratiroides.

Existen dos tipos de hiperparatiroidismo:

1. En el hiperparatiroidismo primario, el agrandamiento de una o más de las glándulas paratiroides producida por hipertrofia glandular o por tumores, provocan la sobreproducción de la hormona, que resulta en hipercalcemia.

2. El hiperparatiroidismo secundario es el resultado de otras enfermedades que producen bajos niveles de calcio en el cuerpo y/o hipersecreción de PTH por las glándulas paratiroides.

En la Tabla 4 se enumeran las diferentes clases de hiperparatiroidismo secundario (38).

Tabla 4. *Causas de hiperparatiroidismo secundario (38).*

<i>Fallo renal</i>
Deterioro de la producción de calcitriol
Hiperfosfatemia
<i>Disminución de la ingesta de calcio</i>
<i>Malabsorción de calcio</i>
Déficit de vitamina D
Cirugía bariátrica
Enfermedad celíaca
Enfermedad pancreática (malabsorción grasa)
<i>Pérdida renal de calcio</i>
Hipercalciuria idiopática
Diuréticos del asa
<i>Inhibición de la resorción ósea</i>
Bifosfonatos
Síndrome del hueso hambriento

En el laboratorio clínico con frecuencia se encuentran cifras de PTH más elevadas que el límite superior de la normalidad, con valores normales de creatinina y/o

filtrado glomerular, calcio y fósforo y que por tanto no se corresponden con un hiperparatiroidismo primario (donde probablemente encontraríamos hipercalcemia) o secundario a un problema renal (donde existiría un descenso del filtrado glomerular y/o un aumento de la creatinina sérica), dato que desconcierta al clínico. En muchos de estos casos, el aumento de PTH, va asociado a déficit de vitamina D, hecho cada vez más constatado en nuestra población y al que no se le ha prestado demasiada atención (10, 39-44).

Es difícil establecer los niveles de vitamina D considerados normales y a partir de los cuales es probable que se produzca una subida anormal de PTH, dado que en los estudios realizados hasta el momento, los niveles de 25 (OH) vitamina D están obtenidos con métodos de laboratorio diferentes, muchos de ellos no estandarizados (44-48).

1.7. DEFICIT DE VITAMINA D ASOCIADO A INSUFICIENCIA RENAL

En la insuficiencia renal crónica se produce en primer lugar un descenso en la filtración glomerular de fosfato que conduce a una hiperfosfatemia. Para contrarrestar este hecho los niveles de PTH y FGF 23 se elevan, con el fin de aumentar la eliminación renal de fósforo.

En los estadios más graves de la enfermedad, la subida de PTH y FGF 23 no es capaz de nivelar los niveles de fosfato. La hiperfosfatemia descende los niveles de calcio a través de una unión físico-químico y descende la actividad de la 1α -hidroxilasa (se debe al FGF23). La 1α -hidroxilasa renal falla también al disminuir la masa renal funcionante. Por este motivo, descende la absorción intestinal de calcio y de fósforo, se produce hipocalcemia, más elevación concomitante de la PTH y desórdenes del remodelado óseo. Nos encontramos ante un síndrome devastador, al que se tiende a denominar en la actualidad “Enfermedad Renal Crónica-Desorden del Metabolismo Mineral” en lugar de Enfermedad Renal Crónica (49).

Los desórdenes del remodelado óseo causados por esta insuficiencia renal contribuyen directamente a la mineralización heterotópica, especialmente a las calcificaciones vasculares y a los trastornos del metabolismo mineral que acompañan a esta patología, hechos clave implicados en el exceso de mortalidad que conlleva.

También se ve afectado el anabolismo esquelético. Con lo cual nos hallamos ante una patología multiorgánica en la que están comprometidos simultáneamente el riñón, el esqueleto, las glándulas paratiroides y el sistema cardiovascular (49).

Dada esta situación, uno de los tratamientos más extendidos entre los pacientes con insuficiencia renal ha sido la administración de 1,25 (OH)₂ vitamina D, que además de aumentar la absorción intestinal de calcio y elevar sus niveles orgánicos, produce una disminución de los niveles de PTH. Sin embargo, este tratamiento no está exento de efectos secundarios, como la aparición de hipercalcemia, por lo que se ha tendido a usar más análogos de la 1,25 (OH)₂ vitamina D, y no el propio metabolito, que producen los mismos efectos y menos trastornos secundarios. Entre estos análogos destacaremos el paricalcitol. Más recientemente se ha introducido el uso de los calciomiméticos moduladores alostéricos del receptor del calcio, que suprimen la síntesis de PTH y su secreción, descendiendo al mismo tiempo los niveles de calcio y fósforo. Sin embargo, no se conoce aún el efecto que producen sobre la salud del hueso o los problemas cardiovasculares.

Así pues, los pacientes en su estadio final de enfermedad renal crónica tienen inhibida la 1 α -hidroxilasa renal, y parecen por lo tanto incapaces de sintetizar 1,25 (OH)₂ vitamina D a partir de su sustrato 25 (OH) vitamina D. La falta del metabolito activo de la vitamina D afectaría fundamentalmente a sus funciones endocrinas entre las que destaca el metabolismo mineral (Ca, PTH, Pi...). Sin embargo, como se ha comentado ampliamente en los apartados anteriores de esta tesis, en la actualidad se sabe que la 25 (OH) vitamina D ejerce acciones importantes en muchos otros sistemas biológicos, gracias a sus funciones autocrinas, previa hidroxilación intracelular a 1,25 (OH)₂ vitamina D.

El déficit de vitamina D se ha asociado a muchas otras enfermedades independientemente de que los individuos que las presentan tengan insuficiencia renal o no (10, 51, 52). Como hemos dicho en apartados anteriores el riñón no es el único órgano que posee receptores de la vitamina D (VDR), además muchos otros tejidos poseen 1 α -hidroxilasa extra-renal, que es capaz de sintetizar “in situ” 1,25 (OH)₂ vitamina D para uso autocrino o paracrino. Este hecho tiene una extraordinaria importancia en los enfermos con insuficiencia renal, ya que su 1 α -hidroxilasa extra-renal sí es funcionante (53).

Un hecho de extraordinario interés es que las 1α -hidroxilasas extra-renales, al contrario de la renal, no se activan ante el descenso de los niveles de $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D, sino que dependen fundamentalmente de los niveles disponibles de sustrato.

Como vemos, los niveles de 25 (OH) vitamina D tienen una gran importancia en los pacientes renales, pero es un hecho que los niveles de 25 (OH) vitamina D se encuentran muy disminuidos en los pacientes en hemodiálisis. Clayton et al. (54), en un estudio realizado en 151 pacientes dializados residentes en Australia donde se tomaron como niveles bajos de 25 (OH) vitamina D aquellos que se encontraban por debajo de 20 pg/ml, observaron que presentaban dichos niveles bajos, un 80% de su población.

En principio, en estos pacientes, lo esperado sería encontrar un déficit casi total de $1,25\text{ (OH)}_2$ vitamina D, debido a su falta de función renal, y, por lo tanto, a su déficit prácticamente total de 1α -hidroxilasa renal, pero no era de esperar “a priori” ese déficit tan acusado de 25 (OH) vitamina D. Las causas del mismo son difíciles de postular, ya que no se encuentra una correlación en nuestros pacientes entre niveles de 25 (OH) vitamina D y niveles de GGT (lo que podría apoyar una mala función hepática y una deficiencia de 25 -hidroxilasa), ni tampoco se encuentra correlación entre los que salen más al aire libre y los que permanecen prácticamente siempre en el interior de sus residencias, hecho que apoyaría la teoría de una falta de exposición al sol. Las causas que parecen implicadas son una menor ingesta de productos ricos en vitamina D, menor exposición solar y la presencia de urocromos que actúan como filtro solar.

Sin embargo, la situación de los pacientes en hemodiálisis es la de unos niveles muy descendidos de 25 (OH) vitamina D, en una proporción significativamente más elevada que la de la población general.

La pregunta que se plantea es: ¿qué niveles de 25 (OH) vitamina D tiene que tener un paciente para que le funcionen bien estas 1α -hidroxilasas extra-renales?, ¿20, 30, 40 ng/ml o una cifra incluso más elevada? Es posible que la concentración de 25 (OH) vitamina D sea determinante en la evolución de la diabetes, la formación de ateromas o las calcificaciones vasculares de un enfermo renal.

Krasniak et al (55) observaron en un grupo de 73 pacientes en hemodiálisis un 80% de frecuencia de calcificaciones vasculares. La magnitud de dichas calcificaciones se correlacionaba negativamente con los niveles de 25 (OH) vitamina D, y lo mismo el

índice de grosor de la íntima-media de la arteria carótida. El número de placas arterioescleróticas se correlacionaba también negativamente con los niveles de 25 (OH) vitamina D. En estos pacientes no era funcional la 1α -hidroxilasa renal y, sin embargo, de alguna manera, la 25 (OH) vitamina D estaba ejerciendo una acción beneficiosa sobre el aparato cardiovascular.

Las guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) aconsejan, basándose en sus teóricos efectos pleiotrópicos, lograr unos niveles de 25 (OH) vitamina D, en los enfermos renales, mínimos de 30 ng/ml sin fijar límite superior, administrando 32.000 UI de calcifediol al mes. Con estas recomendaciones se ha modificado la práctica clínica que durante años se había aplicado respecto a la vitamina D en estos pacientes.

Es necesario profundizar más en la importancia que pueden tener unos niveles correctos de 25 (OH) vitamina D, y en las consecuencias producidas por los mismos sobre el estado clínico de los pacientes con insuficiencia renal.

1.8. OBESIDAD Y CIRUGÍA BARIÁTRICA. CAMBIOS DERIVADOS DE SU REALIZACIÓN

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla, que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2) (56).

En el caso de los adultos, la OMS define el sobrepeso y la obesidad como se indica a continuación:

- Sobrepeso: IMC igual o superior a 25
- Obesidad: IMC igual o superior a 30
- Obesidad mórbida: IMC igual o superior a 40

La obesidad es un problema de salud pública prioritario, debido, por una parte, al gran número de personas afectadas, y que continúa en aumento, y, por otra, a sus graves consecuencias sobre la salud (57, 58, 59). Además es un problema de salud evitable.

Desde 1980, la obesidad se ha más que duplicado en todo el mundo.

En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos y 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos. Es decir que en 2014, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (57, 61).

La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal.

Cabe destacar que, aparte de las consecuencias que tiene el sobrepeso sobre la salud del propio individuo, se ha estimado que la obesidad, y las enfermedades relacionadas con la misma, suponen un coste sanitario del 2 al 7% (61), y que en el caso concreto de España se encuentra en el 7% (60, 62).

La "epidemia" mundial de obesidad está asociada a numerosos problemas de salud pública, incluyendo niveles bajos de vitamina D (63-65). Está bien documentado que los individuos obesos tienen niveles relativamente bajos de vitamina D (64, 65, 66-68). Además, el IMC, el peso corporal, y la masa grasa (FM) se relacionan inversamente con los niveles del suero 25 (OH) vitamina D (69). Las repercusiones potenciales en salud de esta observación son muchas, dada la asociación entre los niveles bajos de vitamina D y el riesgo de síndrome metabólico (70-72), hipertensión, y algunos tumores. Dado que los individuos obesos tienen mayor riesgo para estas comorbilidades, es necesario entender mejor las causas y soluciones potenciales al problema de la deficiencia de la vitamina D en esta población.

La deficiencia de vitamina D puede estar relacionada con la adiposidad mediante diversos mecanismos. Algunos han teorizado que la obesidad se asocia con exposición a luz solar disminuida, menor actividad al aire libre o hábitos de ropa que limitan la síntesis cutánea de vitamina D. Sin embargo, esta asociación no se ha demostrado en estudios clínicos.

La vitamina D es soluble en la grasa. Muchos investigadores han propuesto que el secuestro de metabolitos de vitamina D en los adipocitos disminuye su biodisponibilidad en obesos, en comparación con personas no obesas. Además existen algunos datos experimentales que sugieren que la deficiencia de vitamina D podría promover una mayor adiposidad. La deficiencia severa de vitamina D conduce a elevación de la PTH, que puede promover la entrada del calcio en los adipocitos y así favorecer la lipogénesis. Por otra parte, hay evidencias de que la 1,25 (OH)₂ vitamina D modula la adipogénesis a través de la inhibición del VDR (receptor dependiente de vitamina D), de componentes moleculares críticos de adipogénesis. Por lo tanto, el agotamiento de los almacenes de vitamina D puede conducir a una excesiva diferenciación de preadipocitos a adipocitos (69, 73-79).

La cirugía bariátrica es uno de los tratamientos más eficaces de la obesidad mórbida, resultando en una pérdida significativa de peso en comparación con un enfoque más conservador (80). Además, las operaciones bariátricas parecen disminuir el impacto de las comorbilidades inducidas por la obesidad, como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión arterial, la dislipemia y la anovulación crónica, y se han relacionado con una mejora general de la calidad de vida relacionada con la salud (80).

Entre los diversos procedimientos bariátricos, el *bypass* gástrico en “Y de Roux” (RYGB) representa el método estándar de oro, mientras que la “gastrectomía de manga” (SG) es cada vez más popular en todo el mundo, como un procedimiento independiente. RYGB es una operación combinada, en la que parte del estómago junto con el duodeno y una gran parte del yeyuno son evitados, lo que resulta en restricción de alimentos y malabsorción, produciendo así una pérdida de peso significativa. Por otro lado, la malabsorción de micronutrientes significativos como el calcio y la vitamina D representa un problema clínico común a largo plazo (81).

La integridad del tracto gastrointestinal tiene un papel importante en la homeostasis del calcio, una interacción regulada principalmente por la vitamina D y la paratohormona (PTH) mediada por la absorción de Calcio (82). El hiperparatiroidismo secundario ocurre con frecuencia después de la cirugía bariátrica; Sin embargo, el efecto neto de los procedimientos bariátricos sobre la absorción de calcio y vitamina D no está claramente definido (83, 84).

Muchos estudios han demostrado el déficit de vitamina D en pacientes obesos y en pacientes con obesidad mórbida operados de cirugía bariátrica, por separado (66-68, 71, 81, 83-85). Pero hay escasos estudios donde se comparen los valores de vitamina D antes y después de la cirugía y que se correlacionen con otros parámetros analíticos como la PTH, el IMC, etc. (86, 87).

1. 9. COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN

Durante muchos años las acciones de la vitamina D se centraban en la regulación del metabolismo calcio-fósforo. Sin embargo, más adelante se descubrió la presencia de VDR en muchas células del organismo. A través de esos receptores, la 1,25 (OH)₂ vitamina D produce, por mecanismos de transcripción, un gran número de moléculas diversas, dependiendo del órgano del que se trate. Estas moléculas ejercen un gran número de funciones fisiológicas que pueden o no estar relacionadas con el metabolismo óseo y que abarcan desde la modulación de procesos autoinmunes, mecanismos anticancerosos, resistencia a la insulina, hasta la hematopoyesis y otros muchos mecanismos. Por ello, la presencia de la vitamina D se considera fundamental para el mantenimiento de la salud integral de los individuos.

Junto a esta realidad, está el hecho de que exista a nivel mundial un déficit de vitamina D en la población, y debido precisamente a la importancia de la vitamina D sobre la salud, se plantea a las autoridades sanitarias la necesidad de conseguir unos niveles adecuados.

Entre los numerosos problemas que produce el déficit de vitamina D se encuentra el de desencadenar un hiperparatiroidismo secundario, con las consecuencias que la elevación de la PTH produce en el organismo.

Una población que está especialmente afectada por el déficit de vitamina D es la de los enfermos en diálisis, sin que se hayan estudiado en profundidad las consecuencias que la falta de vitamina D produce en estos pacientes.

Otro tipo de pacientes con niveles muy bajos de vitamina D son los pacientes obesos. A pesar de que se conoce el problema, no existen indicaciones claras del tratamiento que se debe dar a estos enfermos, ni se conocen y ponderan claramente las

consecuencias de este déficit.

Un problema añadido es que los métodos de medida de la 25 (OH) vitamina D, marcador de los niveles de ésta vitamina en sangre, no están debidamente estandarizados, con lo que a veces es complicado saber si un paciente es verdaderamente deficitario.

Todo ello, nos ha conducido a proponer los objetivos que se presentan a continuación.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1.- Determinar el nivel de 25 (OH) vitamina D a partir del cual se produce un hiperparatiroidismo secundario, utilizando un método de determinación de 25 (OH) vitamina D debidamente estandarizado frente al método estándar de cromatografía líquida/gases-masas.

2.- Estudiar la influencia de los niveles séricos de 25 (OH) vitamina D sobre los niveles sanguíneos de los principales parámetros analíticos en los enfermos con insuficiencia renal en estadio V (en diálisis).

3.- Analizar el estado de los niveles de vitamina D y PTH en pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía bariátrica.

4.- Realizar un estudio comparativo entre dos métodos de determinación de 25 (OH) vitamina D utilizados frecuentemente en los laboratorios clínicos.

5.- En función de los resultados obtenidos en estos estudios, valorar la importancia que tiene, para la salud, realizar la determinación de vitamina D en determinados pacientes y mantener unos niveles adecuados de la misma.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Consideraciones generales:

Este proyecto de tesis fue aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz en mayo de 2016.

Se creó una base de datos que contenía a todos los pacientes codificados (sustituyéndose sus nombres por números aleatorios) en la que se recogían sus diferentes variables en estudio (edad, sexo y parámetros analíticos), obtenidos de manera manual a través de los datos del laboratorio clínico del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Para el objetivo 3 se utilizó la base de datos de Cirugía General donde aparecían todos los pacientes operados de cirugía bariátrica desde el año 2010 hasta el año 2015, cedida por el Dr. Peter Vorwald.

Dado que se trataba de un estudio observacional retrospectivo, en el que se pretendía analizar un número elevado de registros analíticos y que los datos fueron extraídos de una base de datos general del laboratorio de Bioquímica, sin tener nunca en cuenta el nombre de los pacientes, se solicitó al CEIC la exención de necesidad de Consentimiento Informado, la cual se aceptó, por lo que no fue necesario obtener dicho consentimiento de los pacientes estudiados.

3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional descriptivo retrospectivo. La investigación consta de 4 partes o estudios independientes que se analizan en los diferentes capítulos del texto y correspondientes cada parte a cada uno de los objetivos. Para ello se parte de pacientes correspondientes al área del Hospital Fundación Jiménez Díaz, que tenían pedido análisis de sangre con niveles de 25 (OH) vitamina D.

3.2.1. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D

3.2.1.1. MATERIALES

Para la realización de este estudio se utilizó la base de datos de pacientes del Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Fundación Jiménez Díaz.

Se estudiaron todos los pacientes a los que se había realizado un análisis de sangre que incluyera valores de 25 (OH) vitamina D, PTH, filtrado glomerular (FG), calcio (Ca) y fósforo (P) entre el 1 de mayo y el 30 de noviembre del 2012. El motivo de tomar los análisis realizados en estas fechas fue porque en ese periodo la determinación de 25 (OH) vitamina D se hizo por electroquimioluminiscencia en un autoanizador Isys (IDS, UK), método de determinación de la vitamina debidamente estandarizado con respecto al método de gases-masas.

Criterios de inclusión de los pacientes:

- Edad igual o mayor de 18 años.
- Que en al menos un análisis clínico de sangre se incluyeran simultáneamente PTH, calcio, fósforo, 25 (OH) vitamina D, y filtrado glomerular (MDRD-4), durante el periodo del estudio.
- Pacientes con historia clínica registrada en la Fundación Jiménez Díaz.
- En el estudio se incluyeron, de todos los pacientes analizados, sólo aquellos con FG mayor de 60 (MDRD-4) y valores séricos de calcio entre 8,4 mg/dl y 10,5 mg/dl, simultáneamente.

Por lo tanto, quedaron excluidos todos los pacientes con insuficiencia renal y valores anormales de calcio, para descartar un hiperparatiroidismo primario o secundario a insuficiencia renal.

3.2.1.2. METODOS

Se creó una base de datos que contenía a todos los pacientes con su identidad codificada en la que se recogían las diferentes variables a estudio (edad, sexo y parámetros analíticos), obtenidos de manera manual a través de los datos del laboratorio clínico del Hospital Fundación Jiménez Díaz.

La determinación de PTH se realizó por electroquimioluminiscencia en un aparato automático ADVIA CENTAURO® (SIEMENS). Se consideraron anormales niveles de PTH mayores de 70 pg/ml. El rango de referencia proporcionado por la casa comercial es de 14-70 pg/ml. Al igual que los restantes métodos de segunda generación, éste mide la hormona intacta 1-84, con la interferencia cruzada de la PTH truncada a nivel amino-terminal. La sensibilidad del método es de 5 pmol/ml y los coeficientes de variación intra e interanálisis son < 7% y < 10%, respectivamente.

La determinación de 25 (OH) vitamina D se realizó por electroquimioluminiscencia en un autoanalizador Isys (IDS, UK). Método de determinación de la vitamina debidamente estandarizado con respecto al método de gases-masas. La sensibilidad del método es de 4 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interanálisis son < 5% y < 7%, respectivamente.

Según el resultado de la 25 (OH) vitamina D los pacientes fueron distribuidos en 4 grupos:

- Grupo 1-Deficiencia severa: Vitamina D menor o igual a 10 ng/ml
- Grupo 2- Deficiencia moderada: Vitamina D entre 10 y menor de 20 ng/ml
- Grupo 3- Insuficiencia: Vitamina D entre 20 y menor de 30 ng/ml
- Grupo 4-Suficiencia: Vitamina D mayor o igual de 30 ng/ml

La determinación de calcio sérico se realizó por la técnica de arsenazo III por un aparato automático ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) con un coeficiente de variación intra e interestudio de < 1,2% y < 2% respectivamente. La sensibilidad de este método es 0,5 mg/dl.

La determinación del filtrado glomerular (MDRD-4 IDMS), se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$TFG \text{ Estimada} = 186 \times \text{Creatinina en Plasma}^{-1,154} \times \text{Edad}^{-0,203} \times 1,21 \text{ si es de raza negra} \times 0,742 \text{ si es mujer}$$

La determinación de la creatinina sérica se realizó por la técnica de picrato alcalino con un autoanalizador ADVIA CENTAURO® (SIEMENS). El coeficiente de variación intra e interestudio es < 3,1% y < 4% respectivamente. La sensibilidad de este método es 0,2 mg/dl.

La determinación de fosforo inorgánico se realizó por una técnica de phosphomolibdate UV con un autoanalizador ADVIA CENTAURO[®], cuyo coeficiente de variación intra e interensayo es < 2,2% y < 3% respectivamente. La sensibilidad de este método es 0,3 mg/dl.

3.2.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el programa estadístico Stava versión 11 se calculó el valor de 25 (OH) vitamina D por el que la PTH se elevaba más de 70 pg/ml con la mayor sensibilidad y la mayor especificidad, calculando el área bajo la curva ROC y comprobando que fuera estadísticamente significativa.

Se realizó también un análisis descriptivo de la muestra calculando el porcentaje de hombres y mujeres, la edad media y mediana. También se calcularon los porcentajes de pacientes con PTH por encima y por debajo de 70 pg/ml y los porcentajes de pacientes con 25 (OH) vitamina D con diferentes valores (pacientes con vitamina D < 10 ng/ml, de ≥ 10 ng/ml a < 24 ng/ml, de ≥ 24 ng/ml a < 30 ng/ml y pacientes con valores ≥ 30 ng/ml). Se describieron las diferencias entre la población con PTH mayor y menor de 70 pg/ml mediante las pruebas de t de Student, Mann-Whitney y Chi²

3.2.2. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE 25 (OH) VITAMINA D Y LOS PRINCIPALES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN DIÁLISIS

3.2.2.1. MATERIALES

Se incluyeron todos los pacientes con insuficiencia renal que estaban en la Unidad de Diálisis de la Fundación Jiménez Díaz en el año 2012, con los que se realizó el estudio observacional titulado “Estudio comparativo entre la determinación de la bio-PTH y la PTH intacta mediante el autoanalizador elecsys. Correlación con el grado de actividad ósea del paciente”. El estudio incluía 145 pacientes de la Unidad de Diálisis, con insuficiencia renal en estadio V estudiados en el año 2012 según trabajo aprobado por el comité ético de investigación clínica número EO43/2011, en el que se comparaban las dos técnicas de determinación de PTH con diversos parámetros bioquímicos. Se aprovecharon los datos de este estudio para realizar una correlación de la vitamina D con todos los parámetros estudiados.

3.2.2.2. METODOS

Se estudiaron 145 pacientes en hemodiálisis de $65,9 \pm 14,6$ años, 74 varones y 71 mujeres, y un tiempo medio de estancia en diálisis de 3 años (P25: 2 años, P75: 6 años). Un 85,1% de los pacientes estaban siendo tratados con algún activador del receptor de vitamina D, y un 17,9% con cinacalcet.

Se realizó una determinación analítica basal lo más completa posible de estos pacientes.

Los parámetros analizados fueron los siguientes: Hemoglobina, hierro, ferritina, transferrina, índice de saturación de transferrina, creatinina, filtrado glomerular, calcio, fósforo inorgánico sérico, fosfatasa alcalina, PCR, proteínas totales séricas, prealbúmina sérica, albumina sérica, Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF-23) sérico (C-terminal), isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina y el PINP y β -CTX en suero. Asimismo, se determinaron la PTH- intacta o PTH de 2ª generación, y la PTH de 3ª generación o PTH-bio.

Los valores de Vitamina D total [25 (OH) vitamina D₂ y D₃] se determinaron por un método de electroquimioluminiscencia realizado en el autoanalizador Elecsys (Roche) con coeficientes de variación intra e interensayo $< 7,5\%$ y $< 8\%$ respectivamente y sensibilidad de 3 ng/ml.

Se determinó la PTH por 2 métodos diferentes, uno de 2ª y otra de 3ª generación:

Los valores de PTH-intacta (PTH_i) o PTH de 2ª generación se determinaron por un método de electroquimioluminiscencia realizado en el autoanalizador Elecsys (Roche), que utiliza un anticuerpo dirigido contra los aminoácidos 26-32 de la molécula de la PTH y otro contra la zona 55-64. Debido a ello no detecta los fragmentos carboxi-terminales, pero sí la PTH 1-84 y los fragmentos largos 7-84. Los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 2,5\%$ y $< 3\%$ respectivamente y la sensibilidad del método 1,2 pg/ml.

Los valores de la PTH de tercera generación o PTH-bio se determinaron por un método de electroquimioluminiscencia realizado en el autoanalizador Elecsys (Roche), que utiliza un anticuerpo dirigido contra los aminoácidos 1-4 de la molécula

PTH y otro contra la zona 55-64, midiendo únicamente la molécula 1-84. Los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 3\%$ y $< 6\%$ respectivamente y la sensibilidad del método es 5,50 pg/ml.

Mediante el autoanalizador ADVIA CENTAURO 2400[®] se determinaron:

1. **La albúmina sérica** (técnica de unión al colorante verde de bromocresol); los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 1,3\%$ y $< 2\%$, y la sensibilidad del método es 1 g/dl.
2. **Las proteínas totales séricas** (técnica del biuret); los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 1,3\%$ y $< 2\%$, y la sensibilidad del método es 2 g/dl.
3. **La proteína C reactiva** (técnica de turbidimétrica potencial con látex); los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 6\%$ y $< 4,9\%$ respectivamente. La sensibilidad del método es 0,003 mg/dl.
4. **La fosfatasa alcalina sérica** (hidrólisis el p-nitrofenil fosfato); los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 1,9\%$ y $< 2,4\%$, y la sensibilidad del método es 5 U/l.
5. **La urea** (reacción enzimática de Roch-Ramel usando ureasa y glutamato deshidrogenasa); los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 1,1\%$ y $< 1,9\%$. La sensibilidad del método es 4 mg/dl.
6. **El hierro** se determinó por colorimetría (el hierro férrico es disociado de su proteína transportadora y reducido a su forma ferrosa. Ésta forma un complejo con la ferrocina, produciendo un cromóforo) los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 2,5\%$ y $< 2,9\%$ respectivamente. La sensibilidad del método es 2 microgramos/dl.
7. **La ferritina** se determinó mediante una técnica turbidimétrica potenciada con látex. Los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 4\%$ y $< 5\%$, respectivamente. La sensibilidad del método es 6,0 ng/ml.

8. **El CO₂** se analizó mediante un análisis enzimático (reacción entre fosfoenolpiruvico-carboxilase de HCO₃⁻ con fosfoenol piruvato para producir oxalacetato), los coeficientes de variación intra e interensayo son < 2,2% y < 3,2%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 5 mmol/l.
9. **El colesterol en suero** se determinó mediante un ensayo enzimático, los coeficientes de variación intra e interensayo son < 0,7% y < 1,4%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 5 mg/dl.
10. **Los triglicéridos** fueron determinados por un análisis enzimático. Los coeficientes de variación intra e interensayo son < 0,6% y < 2,5%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 0,1 mg/dl.

El índice de saturación de hierro fue calculado matemáticamente: hierro sérico x100/transferrina sérica x 1,27.

Los valores de hemoglobina y de hematocrito se calcularon con un aparato ADVIA 120 (SIEMENS). La hemoglobina se calculó por el método de "cianmetahemoglobina" modificado, que mide la absorción en una cubeta de flujo por colorimetría a 546 nm. El hematocrito se calculó matemáticamente con la siguiente fórmula: Eritrocitos x Volumen Corpuscular Medio/10.

Los valores de prealbúmina Sérica se determinaron en un autoanalizador SPA plus mediante turbidimetría, los coeficientes de variación intra e interensayo son < 4,4% y < 6% respectivamente y la sensibilidad es de 0,006 g/l.

El proBNP (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral) se determinó en un autoanalizador VITROS 5600, por un inmunoensayo por quimioluminiscencia por tecnología de MICROPOCILLOS, los coeficientes de variación intra e interensayo son < 3,5% y < 6,0%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 5 pg/ml.

El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) sérico (C-terminal) se determinó mediante un método de ELISA (Immutopics, USA) utilizando 2 anticuerpos policlonales dirigidos hacia la fracción C-terminal del FGF-23. Los coeficientes de

variación intra e interensayo son $< 1,7\%$ y $< 3,5\%$, respectivamente y la sensibilidad del método es de 1,5 RU/ml.

La isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina se determinó en suero mediante una técnica de ELISA (OSTASE BAP, IDS, UK). Los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 4,5\%$ y $< 6,4\%$ respectivamente y la sensibilidad del método es 0,7 µg/l.

La determinación del PINP y del β -CTX en suero se realizaron mediante una técnica de electroquimioluminiscencia en el autoanalizador Elecsys (Roche). Para el PINP los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 2,9\%$ y $< 3,7\%$ respectivamente y la sensibilidad del método es 5 µg/l; para el β -CTX, los coeficientes de variación intra e interensayo son $< 4,6\%$ y $< 4,7\%$, respectivamente y la sensibilidad del método es 0,07 ng/ml.

Los valores de **Tweak** fueron determinados por ELISA (Bender MedSystem, Viena, Austria); los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo son $< 7,1\%$ y $< 8,3\%$ respectivamente. La sensibilidad del método es 10 pg/ml.

Las determinaciones de calcio sérico, fósforo inorgánico y creatinina se realizaron con el mismo método que en el estudio de "Hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D", descrito anteriormente.

3.2.2.3. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la edad media de los pacientes con su desviación estándar y el tiempo medio de estancia en diálisis con los valores de sus cuartiles inferior y superior. Estas variables continuas se expresaron como medida de tendencia central: media y/o mediana y medida de dispersión: desviación típica y rango.

Se estudiaron las características demográficas y clínicas y los valores analíticos de la población estudiada.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en estudio y el resto de los parámetros analizados.

Se analizó, asimismo, el coeficiente de correlación de Spearman entre los valores de hemoglobina y los de PCR de este grupo de pacientes.

3.2.3. VITAMINA D y PTH EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y DESPUÉS DE REALIZARSE UNA CIRUGÍA BARIÁTRICA

3.2.3.1. MATERIALES

Pacientes

Se estudiaron todos los pacientes (180) a los que se les había realizado una cirugía bariátrica entre el año 2010 y el 2015 en el Servicio de Cirugía y Digestivo de la FJG. Pero sólo se incluyeron los pacientes con obesidad mórbida a los que se les había realizado al menos un análisis de sangre antes de la cirugía y otro al año de la misma donde figuraran los valores de PTH y 25 (OH) vitamina D. Los datos de los pacientes fueron recogidos de la base de datos del Servicio de Cirugía Digestiva de la FJD.

Criterios de exclusión:

- Menores de 18 años.
- Pacientes que no tuvieran pedido en un mismo análisis de sangre: 25 (OH) vitamina D, PTH, Ca, P y creatinina.
- Pacientes sin historia clínica registrada en la FJD.
- Pacientes con omisión de peso o talla antes de la cirugía en la historia clínica.
- Pacientes con omisión de peso al año de la cirugía en la historia clínica.
- Pacientes que no tuvieran pedido PTH y vitamina D antes de la cirugía y al año de la misma.

3.2.3.2. MÉTODOS

Se completó, de manera manual, la base de datos de pacientes operados de cirugía bariátrica entre 2010 y 2015 del servicio de Cirugía Digestiva de la Fundación Jiménez Díaz donde se recogían sus diferentes variables en estudio (edad, sexo y parámetros analíticos).

Parámetros bioquímicos: Las técnicas de determinación de Ca, P, hemoglobina, hematocrito, hierro, ferritina e índice de saturación de transferrina fueron

las mismas que en el apartado 3.2.2. "Correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis". La 25 (OH) vitamina D y la PTH fueron determinadas mediante un Analizador ADVIA CENTAURO® (SIEMENS).

Se recogió la talla de los pacientes en centímetros (cm), y el peso en Kilogramos (Kg) previo a la cirugía y al año de la misma.

Se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) previo a la cirugía y al año. $IMC = \text{peso (KG)} / \text{talla}^2 (\text{m}^2)$.

Se registró si tomaban vitamina D antes de la cirugía y el tratamiento al año de la cirugía.

3.2.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas en el estudio. Las variables continuas se expresaron como medida de tendencia central: media y/o mediana y medida de dispersión: desviación típica y rango. Las variables de tipo cualitativo se expresaron como porcentajes. En todos se calculó el intervalo de confianza al 95% de cada una de las estimaciones realizadas.

Se presentaron resúmenes descriptivos de las características demográficas y basales. Se presentaron los recuentos y proporciones para las variables categóricas y los estadísticos descriptivos para las variables continuas.

El análisis estadístico de las variables cualitativas se realizó mediante el test de χ^2 , aplicando la corrección de Yates si procedía.

Para las variables cualitativas se emplearon test paramétricos (t-Student) o no paramétricos (U de Mann-Whitney) en función de su aplicabilidad.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en estudio antes de la cirugía y el resto de los parámetros analizados antes de la cirugía.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes

valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y el resto de los parámetros analizados al año de la cirugía. Así mismo se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la diferencia de los valores de 25 (OH) vitamina D antes y al año de la cirugía y la diferencia de los valores de los parámetros analizados antes y al año de la cirugía.

El análisis estadístico fue realizado con el programa STATA 11.0 por los Servicios de estadística del Hospital Universitario FJD. En todos los análisis, el nivel de significación se estableció en $p < 0,05$.

3.2.4. COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS DE MEDIDA DE 25 (OH) VITAMINA D UTILIZADAS ACTUALMENTE EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

3.2.4.1. MATERIALES

Se separaron 1.000 sueros al azar de pacientes a los que se les había pedido la vitamina D en el laboratorio de Bioquímica de la Fundación Jiménez Díaz en el año 2015 por el método de Siemens y se analizaron estos mismos sueros por el método de Fujirebio

3.2.4.2. MÉTODOS

Se realizaron las determinaciones de 25 (OH) vitamina D de los 1.000 sueros mediante dos técnicas:

1. Analizador ADVIA CENTAURO[®] (SIEMENS). Consiste en un inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia que utiliza un anticuerpo monoclonal murino anti-fluoresceína unido de forma covalente a partículas paramagnéticas (PMP), un anticuerpo monoclonal murino anti-25 (OH) vitamina D marcado con éster de acridinio, y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína. Como medio de separación de la proteína ligadora se utiliza un agente liberador en tampón salino.

Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión con un coeficiente de variación intra e interensayo $< 4,2\%$ y $< 11,9\%$ respectivamente y una sensibilidad funcional de 4,2 ng/ml. Su intervalo de medición es de 4,2-150 ng/ml. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con

otros metabolitos es del 97,4% para la 25 (OH) vitamina D₃, del 106,2% para la 25 (OH) vitamina D₂ y del 1% para el epímero C3 de 25 (OH) vitamina D₃.

2. Analizador LUMIPULSE G1200®(FUJIREBIO): Éste realiza un inmunoensayo no competitivo, tipo sándwich, con detección por quimioluminiscencia que emplea dos anticuerpos, un anticuerpo monoclonal de oveja que se une a la 25 (OH) vitamina D₂ y D₃, y un segundo anticuerpo monoclonal que se une exclusivamente al complejo anteriormente formado. La separación de la proteína ligadora de la vitamina D se realiza mediante un agente químico en 1ª reacción. Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión intraensayo con un coeficiente de variación (CV) $\leq 6\%$, y una sensibilidad funcional de 3,492 ng/ml. Su intervalo de medición es de 4-150 ng/ml. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es de 100% para la 25 (OH) vitamina D₂, y de 19,9% para el epímero C3 de 25 (OH) vitamina D₃.

Las muestras que presentaban más discordancia entre sí (N=50), al analizarlas por los dos métodos, se mandaron a evaluar por el método cromatografía líquida-espectrometría tandem-masas (LC-MS/MS), que es el método de referencia, en el laboratorio del Dr. Etienne Cavalier (departamento de Química Clínica, Universidad de Lieja, Bélgica), para ver qué método se aproximaba más a los valores que se obtenían con el método gases-masa.

La diferencia de resultado entre estas 50 muestras oscilaba entre el 14% y el 133% ($32 \pm 52\%$, media \pm DS) con respecto a la media de los 2 valores obtenidos.

En todos los casos este porcentaje era superior a los coeficientes de variación inter-análisis de los 2 métodos: FUJIREBIO, 6%; SIEMENS, 11,9%.

Analizamos las muestras más discordantes para ver si correspondían a un grupo determinado de pacientes, como por ejemplo gestantes que presentan niveles anormales de proteína ligadora de la vitamina D. Sin embargo, observamos que dichos pacientes pertenecían mayoritariamente a los servicios de Nefrología, Reumatología y Endocrinología, hecho no significativo, ya que estos servicios son los que más demandan la determinación de vitamina D.

Por otra parte, la edad media de estos 50 pacientes era 63 ± 16 años, siendo el

34% hombres y el 66% mujeres, cifras muy similares a las del grupo total de 1.000 muestras (edad 59 ± 18 años con un 37% de mujeres y un 63% de hombres).

Se eligieron las muestras más discordantes entre sí para enviar a analizar por gases-masas porque nuestro objetivo era doble: por una parte comprobar su similitud con la técnica de gases-masas y por otra parte aclarar cuál de las dos técnicas se asemejaba más a la técnica de referencia. Este segundo punto no se podía clarificar si enviábamos las muestras cuyos resultados eran similares.

Se eligió un número de 50 muestras, como la adecuada para el estudio, porque era una cantidad de muestras suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos. Debido al elevado coste de la determinación por gases-masas no fue posible enviar un mayor número de muestras.

3.2.4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó el grado de concordancia de las medidas de vitamina D proporcionadas por los dos aparatos en las 1.000 muestras de suero obtenidas al azar entre las analizadas en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz: ADVIA CENTAURO XP[®] y LUMIPULSE G1200[®].

Calculamos los coeficientes de correlación intraclase (CCI) junto con sus intervalos de confianza al 95%.

Las muestras pertenecían a pacientes con una edad comprendida entre 1 y 92 años (59 ± 18 , media \pm DS) con 37% de mujeres y un 63% de hombres.

Las muestras se dividieron en los grupos con valores de vitamina D < 20 ng/ml y > 20 ng/ml.

Se obtuvo la recta de regresión entre ambos ensayos donde Y corresponde a los valores de LUMIPULSE G1200[®] y X a los del CENTAURO[®].

Con respecto al subgrupo de 50 muestras seleccionadas para analizar por LC-MS/MS, se calcularon los coeficientes de correlación intraclase (CCI) junto con sus intervalos de confianza al 95% entre los valores obtenidos con el método ADVIA

CENTAURO[®] y el analizador de LC-MS/MS, y entre los valores obtenidos con el método LUMIPULSE G1200[®] y el LC-MS/MS.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D

Se analizaron un total de 9.225 pacientes, de los cuales 5.142 quedaron excluidos por ser menores de edad, tener insuficiencia renal o presentar valores anormales de calcio. Por lo tanto, sólo se incluyeron en el estudio un total de 4.083 pacientes, 2.858 (70%) mujeres y 1.225 (30%) varones.

La edad media de la población fue 60 años con una desviación estándar de 15,29 y la mediana de la edad fue 62 años. La edad mínima fue de 18 años y la edad máxima de 100 años. El 74% de la población tenía una PTH por debajo o igual a 70 pg/ml (valores considerados normales) y el 26% mayor de 70 pg/ml. Los datos demográficos de los pacientes se encuentran reflejados en la tabla 5.

Tabla 5. Datos demográficos y valores medios y mediana de PTH y 25 (OH) vitamina D en una población de 4.083 pacientes (2.858 mujeres y 1.225 varones), todos mayores de edad.

	Media	DS	P25	P75	Mediana
Edad (años)	60,69	15,29	51	72	62
PTH (pg/ml)	57,36	38,11	35,50	71,05	50,30
Vit D (ng/ml)	30,70	14,52	21	37	29

Con respecto a los niveles de 25 (OH) vitamina D de nuestra población, sólo el 46,4% de la misma presentaba niveles de este metabolito superiores a 30 ng/ml, un 20,9% presentaba niveles entre 24 y 30 ng/ml, un 30% entre 10 y 23 ng/ml, y un 2,7% niveles ≤ 10 ng/ml (Figura 10).

En la descripción basal de la muestra no había diferencias clínicamente significativas en cuanto a valores de PTH dependiendo del sexo (Tabla 6). Sin embargo, sí había diferencia significativa de edad entre los pacientes con valores normales y anormales de PTH ($59,3 \pm 15,5$ años vs. $64,6 \pm 12,9$ años, $p < 0,001$), siendo de más edad los pacientes con PTH anormal y presentando, además, valores de 25 (OH) vitamina D significativamente menores que los del grupo con PTH normal (Tabla 6).

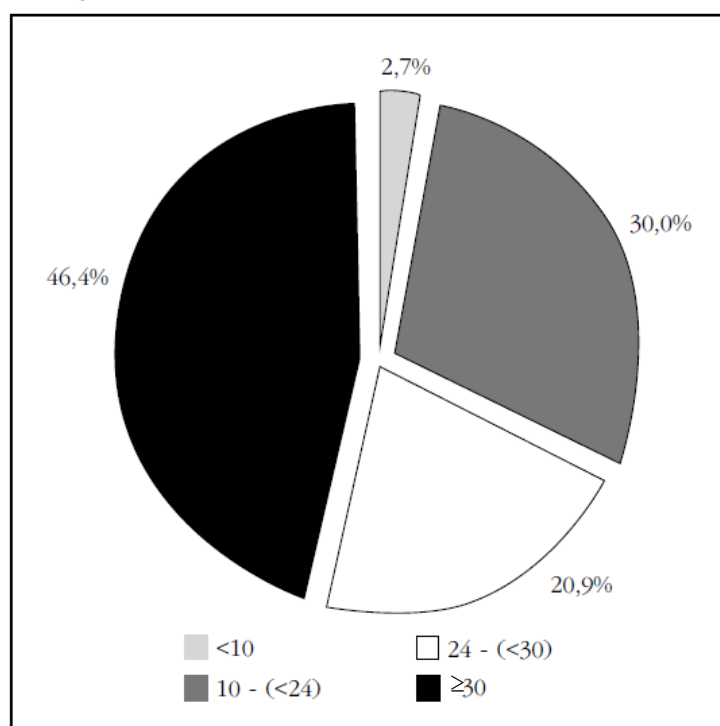


Figura 10. Grupo de pacientes con valores de 25 (OH) vitamina D < 10 ng/ml, entre 10 ng/ml y < de 24ng/ml, entre 24 y 30ng/ml y ≥ 30ng/ml, de una población de 4.083 pacientes (2.858 mujeres y 1.225 hombre), de edad ≥ 18 años, con calcio y fósforo normales y sin insuficiencia renal.

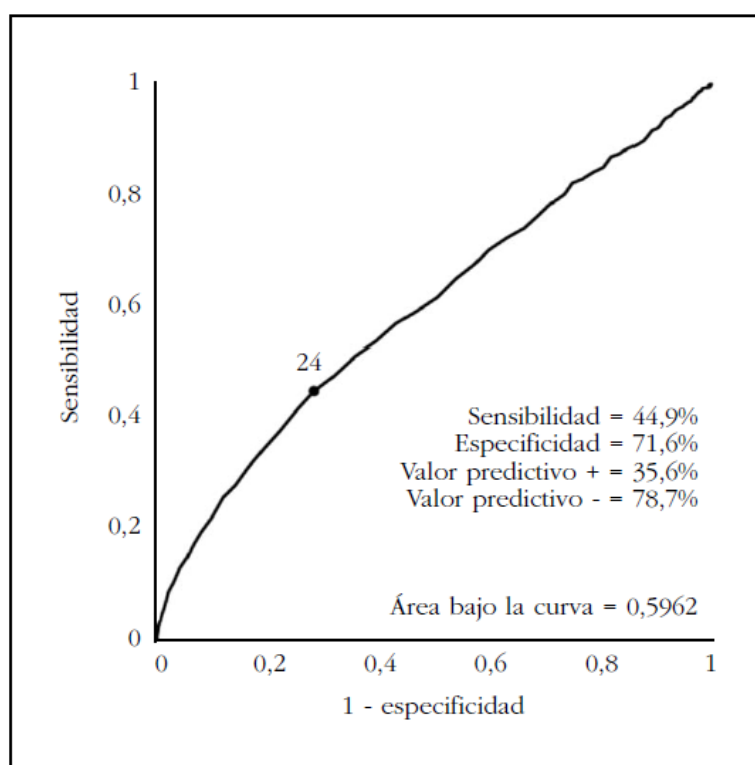
Tabla 6. Comparación de las medias de edad, calcio, 25 (OH) vitamina D, PTH y número de mujeres y varones según tengan los niveles de PTH mayores de 70 pg/ml o menores o iguales a 70 pg/ml en una población de 4.083 pacientes (2.858 mujeres y 1.225 varones), todos mayores de edad.

	PTH ≤70		PTH >70		
Variable	Media	DS	Media	DS	Valor P
Edad (años)	59,3	15,5	64,6	12,9	<0,0001
Calcio (mg/dl)	9,57	3,80	9,52	4,10	0,7231
Vit D25 (ng/ml)	31,8	14,3	27,6	14,6	<0,0001
PTH (pg/ml)	42,5	15,3	99,8	50,0	<0,0001
	N		N		
Mujer	2,123		735		
Varón	900		325		

Con los datos de los pacientes construimos la curva ROC de los niveles de 25 (OH) vitamina D en función de tener valores de PTH por debajo o por encima de 70 pg/ml. Se obtuvo un área bajo la curva de 0,5962 ($p < 0,0001$), que demuestra que existe

una relación entre 25OHD y PTH (Figura 11).

Al utilizar los valores de vitamina D para predecir valores de PTH por encima de 70 pg/ml, el mejor punto de corte teniendo en cuenta conjuntamente sensibilidad y especificidad fue 24 ng/ml (Figura 11).



Vit D (ng/ml)	PTH (pg/ml)	
	≤70	>70
<24	860	476
≥24	2.163	584

Figura 11. Curva ROC obtenida al relacionar los valores de PTH y 25 (OH) vitamina D en una población de 4.083 pacientes (2.858 mujeres y 1.225 varones), todos mayores de edad, con calcio y fósforo normales sin insuficiencia renal. En la tabla inferior se muestra el número de pacientes con niveles de 25 (OH) vitamina D < 24 ng/ml y ≥ 24 ng/ml con PTH ≤ y > 70 pg/ml.

En nuestra población, se halló que un 32,7% de la muestra presentaba unos valores de vitamina D menores de 24 ng/ml, de los cuales un 44,9% tenían valores de PTH mayores de 70 pmol/ml. Al dividir a los pacientes en 3 grupos de edad: de 18 a 40 años, entre 40 y 60 años y mayores de 60, se observó un hecho notable: En el grupo

entre 18 y 24 años, de los pacientes con 25 (OH) vitamina D menor de 24 ng/ml, sólo un 24% presentaban valores de PTH > 70 pg/ml. Entre los pacientes de 40-60 años, el 33,7% de los pacientes con niveles bajos de 25 (OH) vitamina D presentaban un valor elevado de PTH. Y en el grupo de pacientes de más edad (mayores de 60 años), el porcentaje de pacientes con PTH > 70 pg/ml y 25 (OH) vitamina D < 24 ng/ml, llega a ser de 49%. Es decir, que a medida que va siendo más avanzada la edad, la probabilidad de que un nivel de 25 (OH) vitamina D bajo produzca una cifra elevada de PTH es mayor. No existe el mismo riesgo en todas las edades. Es también interesante destacar que, en nuestro trabajo, el porcentaje de pacientes con 25 (OH) vitamina D < 24 ng/ml es el 32,7%, y son similares los porcentajes en los distintos rangos de edad: 33,2%, 31,7% y 32%, respectivamente. Es decir, en nuestra población no encontramos que exista un mayor porcentaje de pacientes con niveles de 25 (OH) vitamina D bajos entre los mayores de 60 años.

4.2. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE 25 (OH) VITAMINA D Y LOS PRINCIPALES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN DIÁLISIS

La tabla 7 muestra las características demográficas y clínicas y los valores analíticos de la población estudiada. De los 145 pacientes, 23 presentaban niveles de 25 (OH) vitamina D menores de 10 ng/ml, 39 valores entre 10 y menores de 20 ng/ml, y 53 valores entre 20 y menores de 30 ng/ml. El resto de pacientes presentaban valores de 25 (OH) vitamina D iguales o mayores de 30 ng/ml. Con respecto a los niveles de hemoglobina en sangre, 33 pacientes mostraban valores < 11 g/dl.

La tabla 8 muestra los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en estudio y el resto de los parámetros analizados. Los resultados muestran una correlación significativa con los parámetros relacionados con el grado de anemia de estos pacientes: hemoglobina $p < 0,032$, hematocrito $p < 0,051$, hierro $p < 0,003$, índice de saturación de hierro $p < 0,002$ y ferritina $p < 0,047$, así como creatinina $p < 0,044$, calcio $p < 0,020$, fósforo $p < 0,041$, (correlación negativa), y albumina $p < 0,041$. No se encontró correlación con ninguno de los otros parámetros estudiados.

Se analizó, asimismo, el coeficiente de correlación de Spearman entre los

valores de hemoglobina y los de PCR de este grupo de pacientes, encontrándose un coeficiente de 0,143 con una $p < 0,088$.

Tabla 7. Características demográficas, clínicas y valores analíticos de una población de 145 pacientes en hemodiálisis, con insuficiencia renal en estadio V.

Variable	
Edad (años)	65,9 ± 14,6
Tiempo en hemodiálisis (años)	Me 3 (P25-2, P75-6)
Sexo masculino (%)	51
Técnica Hemodiálisis (%)	
- Convencional	90
- On-Line	10
Hipertensión (%)	86,9
Diabetes Mellitus (%)	23,4
Dislipemia (%)	35,2
M ± DS	
Hemoglobina (g/dl)	11,8 ± 1,6
Hematocrito (%)	35,5 ± 4,6
Urea (mg/dl)	117,7 ± 36,5
Proteínas totales (g/dl)	6,5 ± 0,6
Albúmina (g/dl)	3,6 ± 0,4
Hierro (µg/dl)	65,4 ± 28
Índice Sat. de Hierro (%)	31,7 ± 14,3
Calcio (mg/dl)	9,2 ± 0,7
Fósforo (mg/dl)	4,7 ± 1,6
CO ₂	21,4 ± 3,5
Colesterol total (mg/dl)	158 ± 35
Prealbúmina (mg/dl)	33 ± 10
Ferritina (ng/dl)	406 ± 242,1
Tweak (pg/ml)	319,2 ± 275,1
Fosfatasa Alcalina Ósea (µg/l)	30,8 ± 33,67
PINP (µg/l)	418,3 ± 730
β-CTX (ng/ml)	1,74 ± 1,23
PTH 2ª gen o PTHi (pg/ml)	298 ± 306,5
PTH 3ª gen o PTHbio (pg/ml)	120,5 ± 172
25 (OH) vitamina D (ng/dl)	21,3 ± 16,225
Creatinina (mg/dl)	7,13 ± 5,63
Fosfatasa alcalina (UI/l)	115,4 ± 83,36
Triglicéridos (mg/dl)	146 ± 82,623
Proteína C reactiva (mg/dl)	1,93 ± 1,8
ProBNP (pg/ml)	8325 ± 8026,15
FGF-23 (RU/ml)	788 ± 424,82

Tabla 8. Coeficientes (coef) de correlación de Spearman y los correspondientes valores p en una población de 145 pacientes en hemodiálisis con insuficiencia renal en estadio V.

Variable	N	Coef.	Valor p
Edad	145	0,061	0,463
FAO	145	0,135	0,106
PINP	145	0,025	0,769
CTX	145	0,032	0,703
PTH roche	145	-0,032	0,703
BIO PTH	145	-0,033	0,694
Hemoglobina	145	0,179	0,032
Hematocrito	145	0,163	0,051
Urea	145	0,122	0,144
Creatinina	145	0,168	0,044
Proteínas totales	145	0,047	0,575
Albúmina	145	0,17	0,041
Hierro	145	0,249	0,003
Índice de Sat. de Hierro	145	0,253	0,002
Calcio	145	0,193	0,020
Fósforo	145	-0,17	0,041
Fosfatasa alcalina total	145	0,06	0,473
CO ₂ suero	143	-0,122	0,146
Colesterol	145	0,15	0,071
Triglicéridos	145	0,018	0,826
PCR	142	-0,053	0,535
Prealbúmina	114	0,092	0,33
Ferritina	145	0,165	0,047
ProBNP	143	-0,007	0,929
Tweak	145	0,107	0,199
FGF23	145	-0,016	0,848
Años en hemodiálisis	145	0,216	0,010
Hidroferol	58	0,191	0,151
Rocaltrol	17	0,334	0,191
Paricalcitol	38	-0,104	0,534
Cinacalcet	24	0,236	0,266
Quelantes Calcio	54	0,102	0,463

4.3. VITAMINA D Y PTH EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y DESPUÉS DE REALIZARSE UNA CIRUGÍA BARIÁTRICA

Se estudiaron un total de 180 pacientes de los cuales se excluyeron 92 por no presentar historia clínica en la Fundación Jiménez Díaz, o por no tener un análisis de sangre con los niveles de PTH, 25 (OH) vitamina D, creatinina, Ca, o fósforo. También se excluyeron aquellos pacientes que no tenían dos análisis de sangre, uno antes de la cirugía y otro al año de la misma, donde se hubieran analizado simultáneamente la PTH y la 25 (OH) vitamina D.

Por lo tanto sólo se incluyeron en el estudio 88 pacientes, 65 mujeres (73,86%) y 23 varones (26,13%), con edad media de 45 años con una desviación estándar de 10,60 y una mediana de edad de 45 con una P25% de 38 y P75% de 55. Los pacientes más jóvenes tenían 23 años y los mayores 65. La técnica quirúrgica empleada fue el *bypass* gástrico en “Y de Roux” por laparoscopia en los 85 de los pacientes.

El IMC medio antes de la cirugía fue 43,74 kg/cm² con una desviación estándar de 5,7 y una mediana de 43 Kg/cm² con una P25% de 40 y una P75% de 47,50. El IMC medio al año de la cirugía fue 31,99 con una desviación estándar de 4,89, y una mediana de 31,32 con una P25% de 28,41 y una P75% de 34,18.

Los datos demográficos y analíticos de los pacientes se encuentran representados en la tabla 9.

En las Figuras 12 y 13 se presentan los porcentajes de pacientes con los diferentes valores de 25 (OH) vitamina D antes y al año de la cirugía, respectivamente.

Antes de la cirugía 42 pacientes estaban tomando calcifediol (a dosis entre 66,5 mcg=4.000 U y 266 mcg=16.000 U a la semana). El resto de los pacientes no estaba tratado.

Con respecto a los niveles de 25 (OH) vitamina D de nuestra población antes de la cirugía, 74 pacientes (84,09%) presentaban niveles de 25 (OH) vitamina D menores de 24 ng/ml a pesar de que 34 de ellos ya tomaban calcifediol, y de éstos, 31 tenían la PTH mayor de 70. Es decir 41,89% de los pacientes con vitamina D menor de 24 tenían la PTH mayor de 70. Valores similares al estudio de hiperparatiroidismo secundario a déficit de 25 (OH) vitamina D, presentado anteriormente.

Al año de la cirugía estos valores cambiaron considerablemente ya que tras la cirugía todos los pacientes tomaban calcifediol a dosis mínimas de 4.000 U por semana. A pesar de ello, 44 pacientes (50%) seguían presentando niveles de 25 (OH) vitamina D menores de 24 ng/ml.

Tabla 9. Datos de 88 pacientes con obesidad mórbida antes y al año de la cirugía bariátrica.

Variable	N	Media	DS	Mediana	P25%	P75%
Estancia PO	88	4,68	2,34	4,00	4,00	5,00
Edad (años)	88	45,48	10,60	45,00	38,00	55,00
Peso (kg)	88	117,55	19,69	116,00	105,50	126,50
Altura (cm)	88	163,98	9,62	161,50	157,00	170,00
IMC.pre (kg/cm2)	88	43,64	5,77	43,00	40,00	47,50
IMC.año (kg/cm2)	88	31,99	4,89	31,32	28,41	34,18
Vit.D.pre(ng/ml)	88	16,88	7,84	16,08	11,67	19,43
PTH.pre (pg/ml)	88	65,29	32,28	59,75	43,00	84,15
Ca.pre (mg/dl)	85	9,18	0,65	9,20	9,00	9,50
P.pre (mg/dl)	82	3,29	0,50	3,30	2,90	3,60
Hb.pre (g/dl)	83	13,94	1,45	13,80	13,10	15,00
Hematocrito.pre (%)	83	42,04	4,13	42,30	39,50	45,10
Hierro.pre (µg/dl)	77	67,99	29,85	66,00	49,00	83,00
Ferritina.pre (ng/ml)	79	82,07	84,36	54,00	28,00	107,00
Sat.ferritina.pre (%)	71	20,59	9,14	20,00	15,00	25,00
Transferrina.pre	72	269,46	49,02	261,00	240,50	302,00
FA.pre(U/l)	12	80,00	28,25	74,50	60,00	90,50
Vit.D.año (ng/ml)	88	28,44	12,71	25,79	20,17	35,29
PTH.año (pg/ml)	88	57,98	27,65	50,05	40,50	70,60
Ca.año (mg/dl)	88	9,24	0,36	9,21	9,00	9,50
P.año (mg/dl)	84	3,73	0,49	3,75	3,30	4,10
Hb.año (g/dl)	88	13,51	1,29	13,45	12,60	14,40
Hematocrito.año (%)	88	41,01	3,96	40,60	38,15	43,45
Hierro.año(µg/dl)	81	83,86	31,26	81,00	58,00	109,00
Ferritina.año(ng/ml)	82	57,91	66,53	39,50	14,00	74,00
Sat.ferritina.año (%)	78	25,69	11,01	25,00	16,00	34,00
transferrina.año	80	274,51	58,17	266,50	240,00	302,00
FA.año(U/l)	13	81,69	28,22	80,00	63,00	87,00

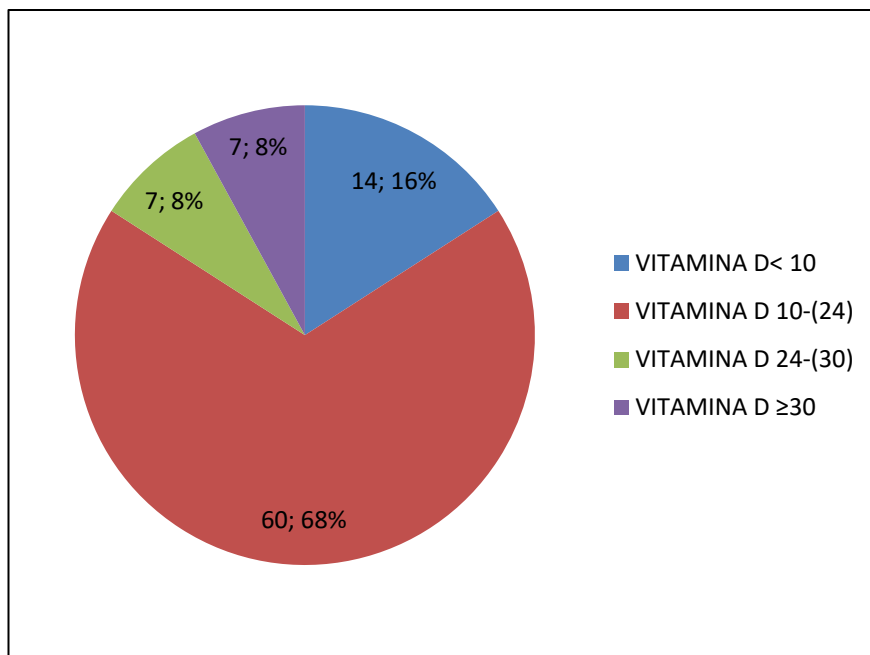


Figura 12. Valores de 25 (OH) vitamina D en 88 pacientes con obesidad mórbida previos a realizarse una cirugía bariátrica.

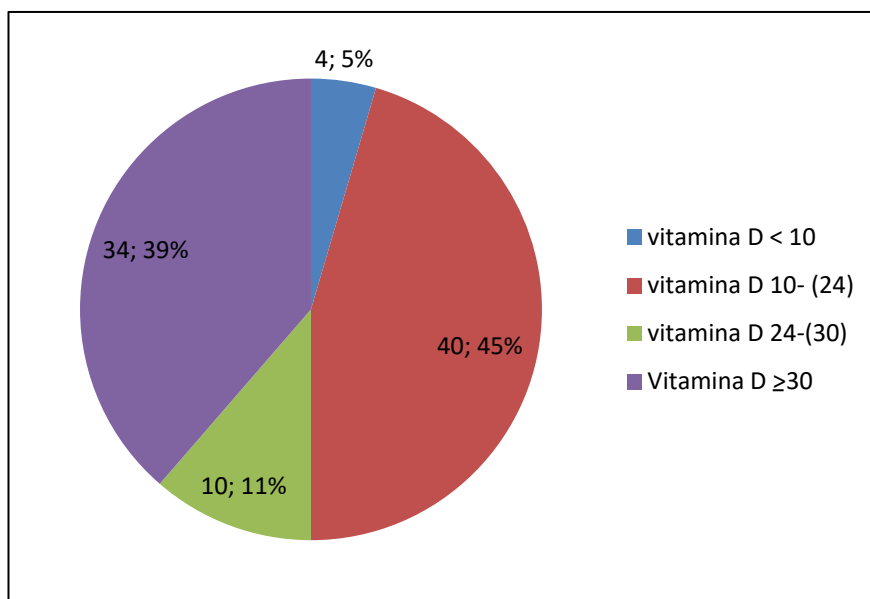


Figura 13. Valores de 25 (OH) vitamina D en 88 pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía bariátrica.

Un total de 22 pacientes tras el año de la cirugía seguían teniendo la PTH mayor de 70 ng/ml y 14 de ellos persistían con valores de 25 (OH) vitamina D menores de 24.

La tabla 10 muestra los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en estudio y el resto de los parámetros analizados previo a la cirugía.

Los resultados muestran una correlación significativa de la 25 (OH) vitamina D con la PTH antes de la cirugía con una $p < 0,042$ (correlación negativa), sin que exista correlación con el IMC, la hemoglobina, el hierro, la ferritina o cualquier otro parámetro.

La tabla 11 muestra los coeficientes de correlación de Spearman y los correspondientes valores de p de la correlación estudiada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en estudio y el resto de los parámetros analizados al año de la cirugía. Los resultados muestran una correlación significativa mucho mayor con la PTH al año ($p < 0,006$, correlación negativa). Se observa, también, una correlación con la hemoglobina ($p < 0,022$) y con el hematocrito ($p < 0,062$) al año de la cirugía, que antes de la misma no existía.

Tabla 10. *Correlaciones de Spearman de la 25 (OH) vitamina D pre-cirugía, con el resto de parámetros estudiados, en pacientes con obesidad mórbida.*

Variable	N	Coef.	p
Edad	88	0,03	0,809
Peso	88	0,11	0,291
Altura	88	0,02	0,86
IMC.pre	88	0,02	0,818
PTH.pre	88	-0,22	0,042
Ca.pre	85	0,03	0,813
P.pre	82	0,02	0,83
Hb.pre	83	-0,14	0,205
Hematocrito.pre	83	-0,13	0,244
Hierro.pre	77	0,09	0,443
Ferritina.pre	79	-0,13	0,249
Satferritina.pre	71	0,19	0,118
Transferrina.pre	72	-0,16	0,182
FA.pre	12	0,01	0,983

Tabla 11. *Correlaciones de Spearman de la 25 (OH) vitamina D al año de la cirugía, con el resto de parámetros estudiados, en pacientes con obesidad mórbida.*

Variable	n	Coef.	P
IMC.año	66	-0,04	0,770
PTH.año	88	-0,29	0,006
Ca.año	88	0,16	0,127
P.año	84	0,10	0,349
Hb.año	88	0,24	0,022
Hematocrito.año	88	0,20	0,062
Hierro.año	81	0,10	0,374
Ferritina.año	82	0,09	0,432
Satferritina.año	78	0,08	0,510
Transferrina.año	80	0,00	1,000
FA.año	13	0,35	0,234

4.4. COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS DE MEDIDA DE 25 (OH) VITAMINA D UTILIZADAS ACTUALMENTE EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

Evaluamos el grado de concordancia de las medidas de vitamina D proporcionadas por los dos aparatos: ADVIA CENTAURO XP® y LUMIPULSE G1200®. Para ello, calculamos los coeficientes de correlación intraclase (CCI) junto con sus intervalos de confianza al 95%. Los resultados obtenidos indican que existe una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932). No existen diferencias significativas en el CCI si se dividen las muestras en los grupos con valores de vitamina D ≤ 20 ng/ml y > 20 ng/ml.

La recta de regresión obtenida entre ambos ensayos fue $Y=1,221+1,035X$, donde Y corresponde a los valores de LUMIPULSE G1200® y X a los del CENTAURO®. Se observa que los valores de LUMIPULSE G1200® son un 10% superiores a los de CENTAURO® (Figura 14).

Con respecto al subgrupo de 50 muestras seleccionadas para analizar por LC-MS/MS, se ha obtenido un CCI=0,987 con el analizador LUMIPULSE® y un CCI=0,938 con el analizador CENTAURO®. Aunque ambos son satisfactorios, el coeficiente de correlación intraclase más elevado es el de LUMIPULSE®, por tanto, las mediciones de este aparato se parecen más a las exactas (Figuras 15 y 16).

A continuación, con nuestro subgrupo de 50 muestras seleccionadas, realizamos las gráficas de Bland-Altman, donde el eje X corresponde a las medias de cada par de observaciones y el eje Y a las diferencias entre cada par de observaciones. En los gráficos hay dos líneas continuas horizontales. La línea continua gris está trazada a la altura del valor cero; si las medidas dadas por el aparato fueran idénticas a las medidas exactas, los puntos deberían situarse justo en esta línea. La línea continua azul representa la media de las diferencias. Si esta línea está por debajo de la línea del valor 0, quiere decir que el aparato tiende a dar medidas inferiores al valor exacto, y si está por encima lo contrario.

Como podemos observar en la figura 17, la media de las diferencias entre el analizador LUMIPULSE G1200® y el método de referencia LC-MS/MS es de un 20%; por tanto, dicho inmunoensayo infraestima los valores de 25 (OH) vitamina D en un 20% con respecto al patrón-oro. En la figura 18, apreciamos cómo en el caso del analizador CENTAURO® la media de las diferencias es de un 42%, por lo cual los valores que arroja esta técnica son muy inferiores a las del método de referencia. Por otro lado, la técnica LUMIPULSE G1200® presenta una menor dispersión en los resultados.

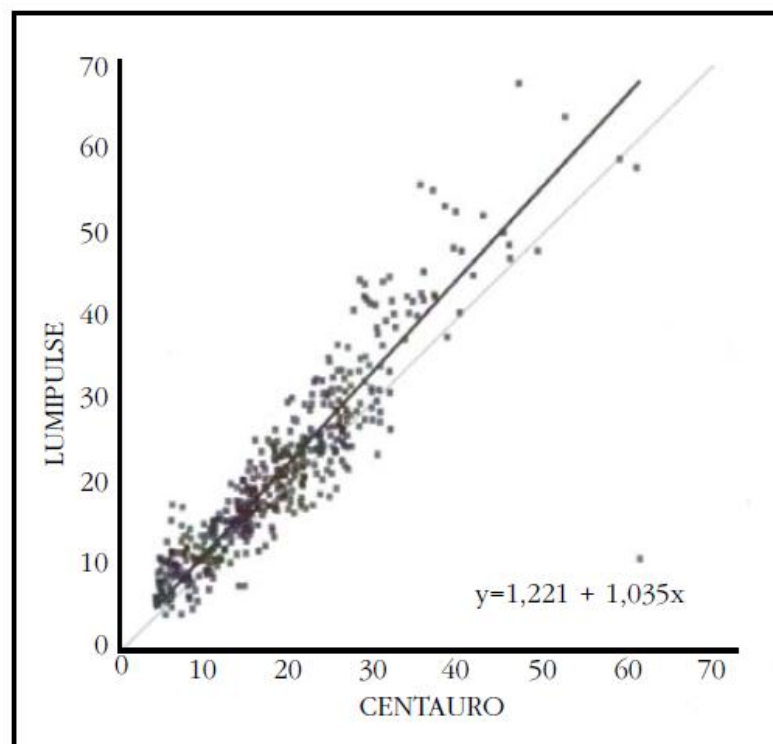


Figura 14. Recta de regresión entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y CENTAURO® (SIEMENS) utilizando 1.000 muestras de suero de pacientes de la Fundación Jiménez Díaz.

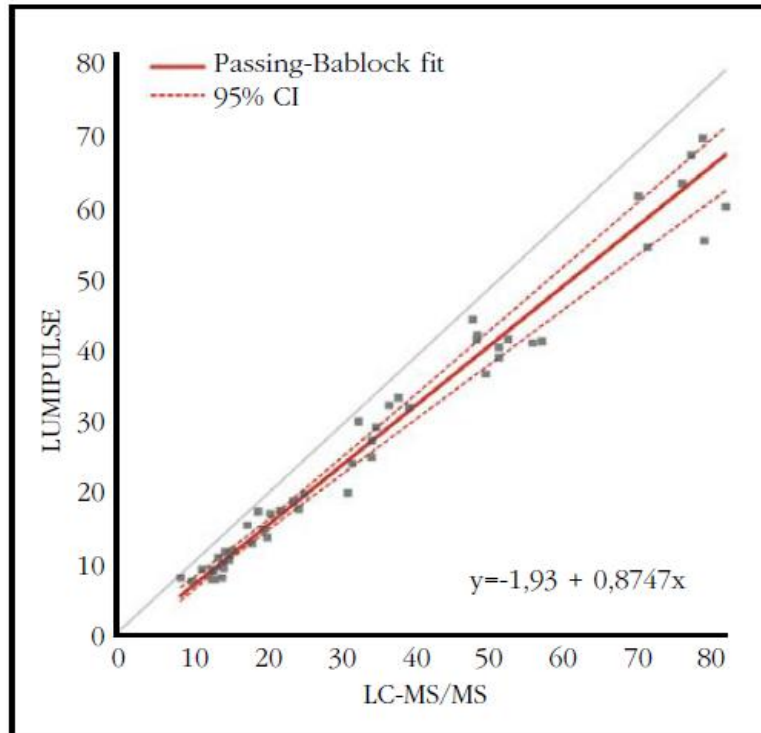


Figura 15. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos).

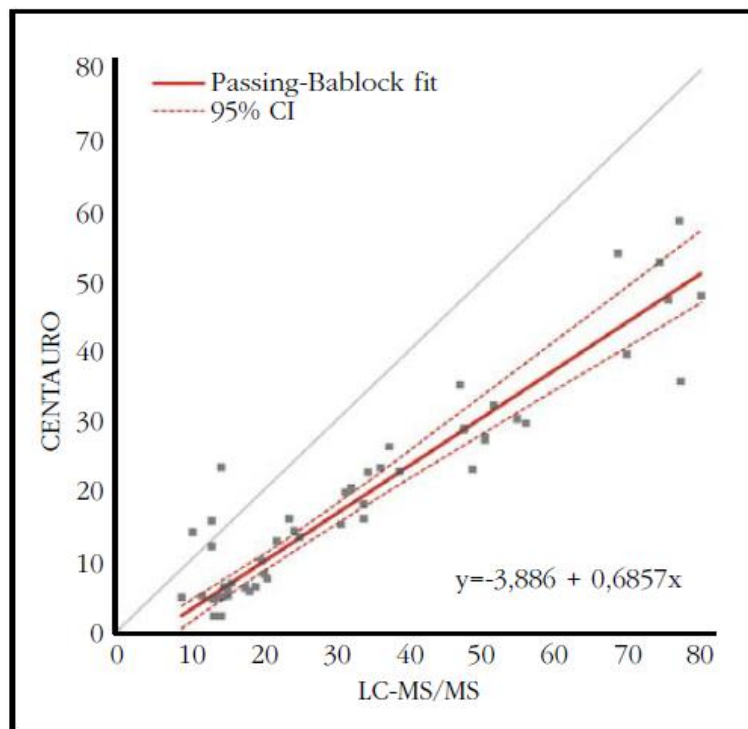


Figura 16. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre CENTAURO® (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos),

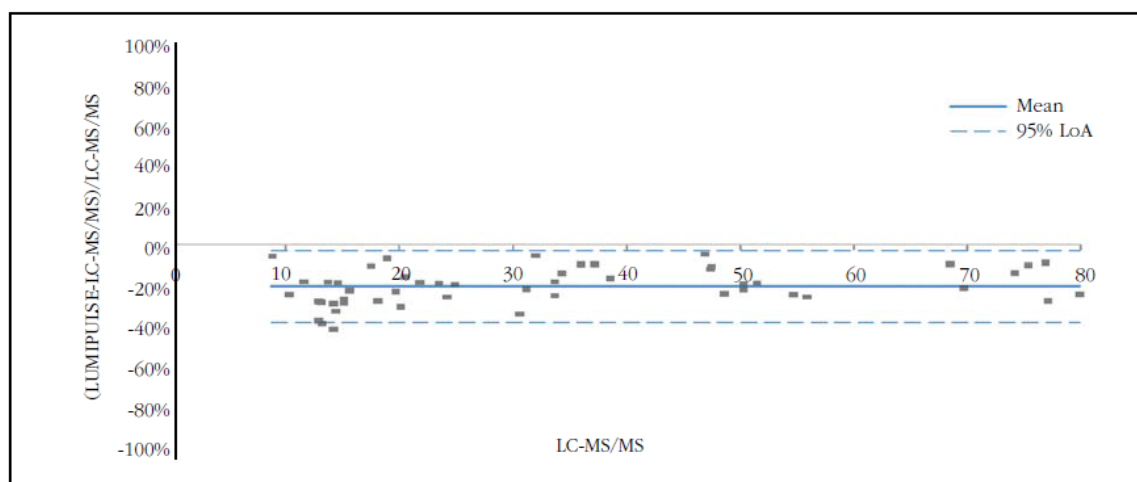


Figura 17. Gráficas de Bland-Altman entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos).

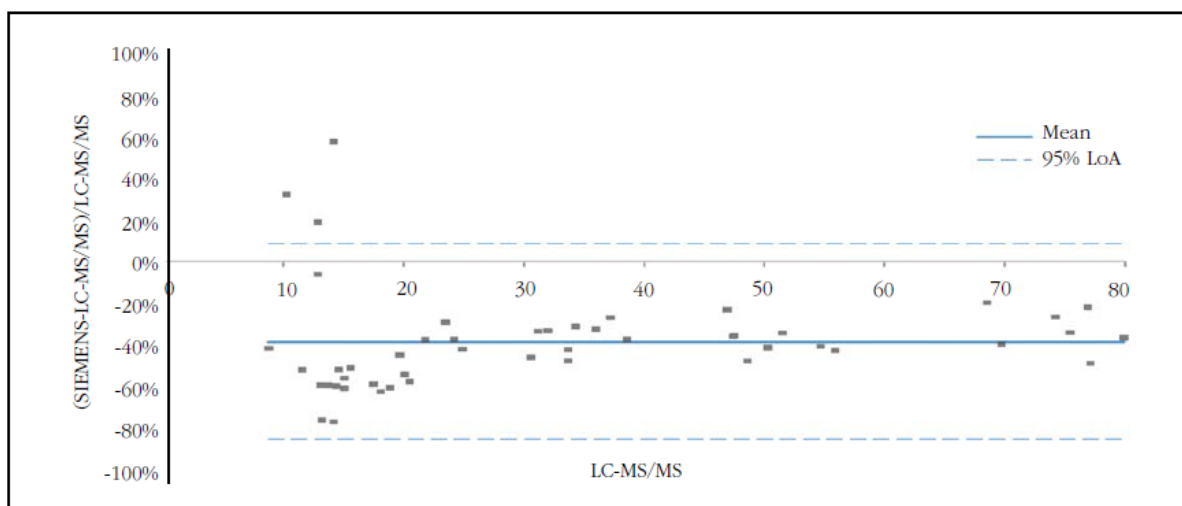


Figura 18. Gráficas de Bland-Altman entre CENTAURO® (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D

En nuestro estudio el valor de 25 (OH) vitamina D con máxima especificidad y sensibilidad para elevar la PTH por encima de 70, fue 24 ng/ml (Figura 11). Valor superior al presentado en trabajos anteriores, que se encontraba alrededor de 18 ng/ml (88).

De los pacientes que presentaban una PTH superior a 70, el 44,9% tenían una 25 (OH) vitamina D menor de 24. De los pacientes que tenían valores normales de PTH, el 71,6% tenían valores de 25 (OH) vitamina D por encima de 24 (Tabla de la Figura 11). Conforme los valores de PTH iban siendo mayores era más probable que los pacientes presentaran una 25 (OH) vitamina D más baja. Dado que este estudio corrobora nuestra suposición de que un déficit de vitamina D eleva los valores de PTH, consideramos necesario en la práctica clínica pedir niveles de 25 (OH) vitamina D en aquellos pacientes en los que se hallen valores de PTH anormalmente altos (sin causa aparente), para descartar un hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D. Este hiperparatiroidismo simplemente se corregiría suplementando a los pacientes con la vitamina D necesaria, evitando así patologías producidas por la elevación de la PTH, como la osteoporosis.

En la mayoría de los estudios realizados hasta ahora se utilizaban diferentes métodos de determinación de vitamina D, por lo que había una gran variación entre los resultados de 25 (OH) vitamina D obtenidos, y era difícil establecer los niveles de vitamina D considerados normales y a partir de los cuales era probable que se produjera una subida anormal de PTH. Las diferentes técnicas de laboratorio utilizadas para determinar la 25 (OH) vitamina D son: radio-inmunoensayo, electroquimioluminiscencia, HPLC o cromatografía lipídica y espectrometría tandem-masas.

Actualmente la técnica que se considera más correcta es la de cromatografía líquido/tándem-masas, que sin duda es la más exacta de las existentes (31) y hay calibradores de referencia validados frente a esta técnica. En nuestro estudio se ha

utilizado electroquimioluminiscencia con un autoanalizador Isys (IDS, UK), debidamente estandarizado con respecto a gases-masas, por lo que los resultados obtenidos se consideran válidos, y comparables a los estudios realizados con otros métodos que estén bien calibrados.

En la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre la vitamina D no se plantea discusión sobre el método utilizado, ni se especifica si el método está calibrado con respecto a la técnica de gases-masas (43, 89). Esto no permite saber si los resultados de los valores de vitamina D hallados en dichos estudios son correctos, y si se podrían extrapolar a la población general, para ser aplicados a la práctica clínica una vez que el profesional encuentra unos determinados valores en los análisis de sus pacientes.

Con los resultados de nuestro estudio, realizado con un método debidamente calibrado, como se ha expuesto anteriormente, se puede decir que hasta el 71,6% de pacientes con 25 (OH) vitamina D igual o mayor de 24 presenta niveles de PTH dentro de la normalidad. El clínico tendría que tratar a aquellos pacientes con valores de 25 (OH) vitamina D menores de 24, de cara a evitar un posible hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. Siempre y cuando el método utilizado en su laboratorio fuera el mismo que el utilizado en nuestro estudio o estuviera igualmente estandarizado respecto al método gases-masas.

5.2. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE 25 (OH) VITAMINA D Y LOS PRINCIPALES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN DIÁLISIS

Los resultados de nuestro estudio sobre los pacientes con insuficiencia renal en diálisis, muestran una estrecha correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes en hemodiálisis estadio V, y sus niveles de hemoglobina, hematocrito, hierro, índice de saturación de hierro y ferritina. Es decir, que existe una correlación estrecha entre los valores de 25 (OH) vitamina D y el grado de anemia de estos pacientes. Como era de esperar, hemos encontrado también una correlación entre los niveles de Ca y P (ésta negativa) y los niveles de 25 (OH) vitamina D en los pacientes con insuficiencia renal crónica, dado el papel de la vitamina D en el metabolismo Ca-P. La correlación con los niveles de albúmina era también de esperar, dada la relación de los niveles de 25 (OH) vitamina D con el estado de nutrición de los pacientes (Tabla 8).

Precisamente, la anemia es una de las principales complicaciones de los estadios finales de la hemodiálisis (90). Dicha anemia puede conducir a otras morbilidades como un aumento de las complicaciones vasculares, con descenso en la calidad de vida, y mayor mortalidad. Por ello, es fundamental el conocimiento de los mecanismos que pueden conducir a la anemia de estos pacientes.

La eritropoyetina (EPO) es el tratamiento de elección para la anemia en los pacientes con insuficiencia renal, que hay que administrar a prácticamente todos, en los estadios finales de la enfermedad. Con el tiempo, se suele desarrollar en estos pacientes una falta gradual de sensibilidad a la administración de EPO, de modo que se tienen que subir las dosis para mantener los niveles de hemoglobina en el rango ideal.

Se han sugerido diferentes mecanismos que conducen a la falta de respuesta a la administración de EPO, como la deficiencia de hierro, la de vitamina B12, el hiperparatiroidismo secundario, la inflamación crónica y la existencia de tumores, pero ninguno llega a explicar con total claridad este hecho. En los últimos años diversos trabajos han sugerido que la deficiencia de vitamina D puede ser uno de los factores de riesgo, implicados en la falta de respuesta a la EPO (10, 91, 92).

En un trabajo realizado en 2015, Naini et al. (93) administraron 50.000 UI de vitamina D/semana durante 12 semanas, a 32 pacientes con hemoglobina < 11 g/dl y en hemodiálisis en fase final. A otros 32 pacientes no los trataron. La media de los niveles de hemoglobina varió entre 9,91 y 10,14 g/dl en el grupo control y de 9,93 a 11,1 g/dl en el grupo de intervención. Una comparación entre las dosis de EPO requeridas de los dos grupos mostró un descenso significativo en el grupo de tratamiento ($p < 0,001$).

De modo similar, Kumar et al. (94) trataron durante 4 meses con ergocalciferol a 81 pacientes en hemodiálisis. A los que tenían niveles de 25 (OH) vitamina D entre 10 y 30 ng/l les trataron con 50.000 UI de ergocalciferol x4 y a los pacientes con niveles < 10 ng/ml les trataron con 50.000 UI x 6. Los niveles medios de 25 (OH) vitamina D en los 81 pacientes eran de $15,3 \pm 7,10$ ng/l y se incrementaron a $28,5 \pm 8,6$ ng/ml después del ergocalciferol. La media basal de las dosis de EPO era de 21.933 U/mes y descendió a 18.400 U/mes tras el tratamiento con ergocalciferol. Debido a ello, estos autores recomiendan una suplementación más agresiva con ergocalciferol en el futuro, para conseguir niveles mayores de 30 ng/ml de 25 (OH) vitamina D.

Kiss et al (90) analizaron los datos de 142 pacientes en hemodiálisis. Al igual que en nuestro trabajo, encontraron los niveles de 25 (OH) vitamina D correlacionados significativamente y de modo independiente con la hemoglobina y también inversamente correlacionados con la dosis de EPO requerida para mantener los niveles de hemoglobina.

Coincidiendo con nuestros resultados, Patel et al. (95) estudiaron 1.661 pacientes con enfermedad renal crónica. Los niveles de 25 (OH) vitamina D y 1,25 (OH)₂ vitamina D de estos pacientes se correlacionaban independientemente con niveles descendidos de hemoglobina y anemia.

Rianthavorn et al. (96) demostraron que la administración de ergocalciferol más 1,25 (OH)₂ vitamina D reducía la dosis de eritropoyetina necesaria para tratar niños con insuficiencia renal crónica en estadio V.

Riccio et al. (97) demostraron así mismo que el paricalcitol exhibía efectos beneficiosos sobre los niveles de hemoglobina en pacientes en hemodiálisis en estadios finales, independientemente de otros factores como la inflamación o la PTH.

Nuestros resultados (Tabla 8) y los de otros autores parecen demostrar claramente que los niveles de vitamina D están asociados con la anemia, pero se desconoce el mecanismo exacto que conduce a este hecho. La mayoría de los estudios que relacionan la deficiencia de vitamina D y el grado de anemia renal apuntan al papel prevalente de la inflamación en este mecanismo (98).

La activación de los VDR inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias del estroma y eleva la liberación de IL10, ejerciendo actividad anti-inflamatoria y efectos proliferativos sobre los progenitores eritroides. En los pacientes con insuficiencia renal la deficiencia de vitamina D puede estimular a las células inmunes en el micro ambiente de la médula ósea, a producir citoquinas, provocando un fallo en la eritropoyesis (99). A este respecto, Kendrick et al. (100) estudiaron 16.301 pacientes en el “National Health and Nutrition Examination Survey: NHANES III”, observando que los niveles descendidos de 25 (OH) vitamina D y elevados de proteína C reactiva estaban asociados independientemente con concentraciones menores de hemoglobina en sujetos con insuficiencia renal crónica que no requerían diálisis. En nuestro estudio, no hemos encontrado una correlación entre niveles de 25 (OH) vitamina D y proteína C reactiva,

lo que parece descartar que sea un aumento de la inflamación la causa del desarrollo de la anemia en nuestros pacientes. Por otro lado, hemos querido estudiar la posible correlación entre la proteína C reactiva y los niveles de hemoglobina en nuestro grupo de pacientes, no encontrando una correlación significativa entre ambos parámetros, aunque sí próxima a la correlación ($p < 0,088$). Esto podría indicar que la inflamación afecta a la anemia, pero de manera independiente a la de la vitamina D.

En la última fase de la eritropoyesis, la eritropoyetina es el estímulo fundamental de la maduración eritroide y la falta de esta hormona es la mayor causa de la anemia en la insuficiencia renal (101). Recientes estudios sugieren que la vitamina D juega un papel fundamental en la síntesis de eritropoyetina (95).

Otro posible mecanismo sobre la anemia en los pacientes con insuficiencia renal es que la vitamina D estimule directamente los precursores eritroides. Se han descubierto numerosos VDR en muchos tejidos no renales, incluida la médula ósea (102, 103). La normalización de los niveles de 25 (OH) vitamina D en este tejido puede provocar una cantidad suficiente de sustrato para la 1,25-hidroxilasa extra-renal, y estas concentraciones elevadas de 1,25 (OH)₂ vitamina D en los tejidos hematopoyéticos pueden activar directamente las células precursoras eritroides (104). De hecho, hay autores que postulan que la administración de 25 (OH) vitamina D puede acarrear más beneficios, para mejorar la anemia de los enfermos con insuficiencia renal, que la administración de 1,25 (OH)₂ vitamina D, que proporcionaría el sustrato a la médula ósea para sintetizar 1,25 (OH)₂ vitamina D de modo autocrino o paracrino (105).

Con respecto al mecanismo de reducción de la actividad de la EPO en el caso de la deficiencia de vitamina D, está también relacionado con la producción de citoquinas proinflamatorias, que estimulan la síntesis de hepcidina. La hepcidina, un pequeño polipéptido producido y segregado por el hígado, es un mediador de la absorción y la utilización del hierro. La excesiva producción de hepcidina contribuye a que no haya hierro disponible para los precursores eritroides y por lo tanto, a que se desarrolle la anemia aunque exista suficiente cantidad de eritropoyetina (106).

Algunos autores apuntan también a un papel importante de la hipersecreción de PTH en la anemia renal, que tendría efectos directos sobre la síntesis de eritropoyetina endógena, los progenitores de la médula ósea y la supervivencia de los glóbulos rojos.

Podría ocurrir que los efectos beneficiosos de la vitamina D en controlar la hipersecreción de PTH determinaran una mejora de la anemia en los pacientes renales (107). Pero en nuestro trabajo no se ha encontrado ninguna correlación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los niveles de PTH, tanto la PTH-intacta, como la bio-PTH (Tabla 7). Otros autores también consideran que el efecto beneficioso de la vitamina D sobre la anemia de los pacientes renales es independiente de la supresión de la PTH (98).

En conclusión, los niveles de 25 (OH) vitamina D están estrechamente relacionados y parecen condicionar el grado de anemia de los pacientes con insuficiencia renal crónica. Dado que la anemia es una de las principales complicaciones en los estadios finales de la hemodiálisis, resulta de extraordinaria importancia la medida y el mantenimiento de los niveles de 25 (OH) vitamina D en los pacientes con insuficiencia renal crónica en estadios finales, ya que ello es capaz de reducir sus niveles de anemia y a su vez las cantidades de eritropoyetina necesarias para mantener un hematocrito aceptable.

5.3. VITAMINA D y PTH EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA ANTES Y DESPUÉS DE REALIZARSE UNA CIRUGÍA BARIÁTRICA

En el estudio sobre los pacientes con obesidad mórbida a los que se les realizó cirugía bariátrica encontramos que el 88,2% de nuestra población (74 pacientes) presentaban, antes de la cirugía, niveles de 25 (OH) Vitamina D menores de 24 ng/ml. Otros autores ya han descrito que la obesidad está asociada con una deficiencia de vitamina D (63, 66-68, 86, 108). Meta-análisis recientes evidencian que la prevalencia de deficiencia de vitamina D es diferente entre los grupos control y los obesos (64, 65).

Las causas de la deficiencia de vitamina D en la obesidad son multifactoriales. Una de ellas es el estilo de vida sedentario de estos pacientes con baja exposición al sol y poca actividad exterior (109). Pero quizá la causa más importante sea la reducción de la biodisponibilidad de la 25 (OH) vitamina D en relación con su secuestro por el tejido adiposo presente en exceso en los obesos (82). Una hipótesis alternativa considera que los bajos niveles de 25 (OH) vitamina D en los obesos son el resultado de una dilución volumétrica de la vitamina D en los amplios depósitos de grasa de estos pacientes. También podemos entender por qué la vitamina D administrada oralmente a los obesos tiene menos impacto en el suero que en los no obesos al quedar almacenada

principalmente en el tejido adiposo (110). Hay autores como Poddar (63) que sugieren que los pacientes con obesidad requieren dosis mayores de suplementación con vitamina D que los pacientes de la misma edad no obesos. Y de hecho, recomiendan administrar 2-3 veces la cantidad de vitamina D, que se requiere para la población general, en los pacientes con obesidad para alcanzar los mismos niveles de vitamina D (30). Además existe un descenso de la producción hepática de 25 (OH) vitamina D debido a la esteatosis y a un descenso de la síntesis de vitamina D en la piel (111, 112).

Otro punto interesante es que la resistencia lipolítica a las catecolaminas y al péptido natriurético en los pacientes obesos y los adipocitos insulino-dependientes pueden conducir a una disminución de la liberación de la vitamina D desde el tejido adiposo. El mecanismo que controla el almacenamiento y la liberación de la vitamina D desde el tejido adiposo no se conoce bien. Puesto que la vitamina D es un secoesteroide soluble en lípidos, estaría sometido a la misma vía metabólica de la lipólisis inhibida por catecolaminas que el colesterol. Los adipocitos humanos expresan enzimas metabolizadoras de la vitamina D, sugiriendo que el tejido adiposo no sólo acumula vitamina D pasivamente, sino que este metabolismo posiblemente también cambie en la obesidad (74, 75, 113, 114).

En un reciente trabajo, De Nisio et al (110) presentan la hipótesis de que el tejido adiposo secuestra la vitamina D, pues en la obesidad la liberación de vitamina D mediada por la lipólisis está alterada, concomitantemente con una manipulación enzimática alterada. Estos autores observaron una disminución considerable de la liberación lipolítica de la vitamina D y de la 25 (OH) vitamina D estimulada por la adrenalina en explantes de grasa de individuos varones obesos, que se puede explicar por una reducción del receptor β -adrenérgico.

Coincidiendo con nuestros resultados (figura 12 y 13), Chakhtoura et al (83) analizaron 51 estudios observacionales que medían el estado de vitamina D pre y post cirugía bariátrica. Los niveles de vitamina de 25 (OH) vitamina D estaban por debajo de 30 ng/ml en 29 estudios y 17 de estos 29, mostraban niveles ≤ 20 ng/ml. En el trabajo de nuestra tesis encontramos un nivel medio de 25(OH) vitamina D de 16,9 en los pacientes pre-cirugía (Tabla 9).

La obesidad también se suele asociar a un hiperparatiroidismo secundario (108).

Este hiperparatiroidismo puede ser secundario precisamente a la deficiencia de vitamina D, como hemos demostrado en los resultados del apartado 4.1., y discutido en el apartado 5.1., correspondiente al "hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D" y que ha dado lugar a una publicación reciente de nuestro grupo de trabajo (115). En dicho trabajo encontramos el punto de corte de la 25 (OH) vitamina D, a partir de la cual se incrementa la probabilidad de desarrollar un hiperparatiroidismo secundario, en 24 ng/ml (Figura 12). En el presente trabajo, 31 de los pacientes obesos con 25 (OH) vitamina D menor de 24 ng/ml presentaban unos valores de PTH mayores de 70 pg/ml (el índice superior de normalidad), es decir un 41,9 % de dichos pacientes. Este porcentaje es similar al obtenido en los resultados del apartado 4.1. de la tesis. La relación entre los niveles de vitamina D y PTH de nuestros pacientes obesos antes de la cirugía viene avalada por la correlación significativa que hemos encontrado entre ambos parámetros ($p < 0,042$) (Tabla 10).

Aunque la hipovitaminosis D podría ser la causa del hiperparatiroidismo secundario observado en los pacientes obesos, parece que podrían existir también otras causas. Hultin H et al. (116) observaron una anomalía en la curva Ca/PTH de los pacientes con obesidad mórbida, estos autores concluyeron que los niveles de PTH máximos se alcanzarían a valores más bajos de Ca que en la población control y especulan con que en los pacientes con obesidad mórbida esta respuesta sería provocada por un mecanismo compensatorio en los estadios tempranos de hiperparatiroidismo secundario, supuestamente debido a una deficiencia pronunciada de la vitamina D.

En el presente trabajo, después de la cirugía bariátrica, hemos encontrado un incremento de los niveles de vitamina D, entre otras causas debido a que el tratamiento con 25 (OH) vitamina D post-cirugía fue prácticamente universal, recomendando a los pacientes dosis mínimas de 4.000UI/semana de vitamina D. A pesar de ello, en nuestro trabajo 44 pacientes (50% del total) seguían presentando niveles de 25 (OH) vitamina D < 24 ng/ml. (Tabla 8, figura 13). Obispo Entrenas et al. (86) encontraron en una población de pacientes con obesidad mórbida, que el 77% presentaban deficiencia de vitamina D antes de la cirugía, y después de ésta sólo el 18% consiguió normalizar estos valores. Peterson et al. (87) estudiaron el estatus de vitamina D antes y después de la cirugía bariátrica, encontrando que la prevalencia de hipovitaminosis D permanece similar después de la cirugía y era superior si el método quirúrgico era *bypass* gástrico en "Y de Roux". Chackhtovna et al. (83) analizaron el estatus de vitamina D después de

la cirugía bariátrica en 51 trabajos y encontraron que la media de los niveles de 25 (OH) vitamina D permanecía por debajo de 30 ng/ml después de la cirugía bariátrica a pesar de los diferentes regímenes de suplementación, con muy pocas excepciones. El incremento en la 25 (OH) vitamina D tiende a relacionarse con la dosis administrada de vitamina D, pero varía mucho de unos estudios a otros. Se consigue un incremento de 9-13 ng/ml cuando se usan dosis de vitamina D de 1.100-7.100 UI/día. Estos autores no observaron diferencias entre los niveles de vitamina D en función de la cirugía empleada.

Lespessailles et al (82) revisaron las causas principales por las que se produce la deficiencia de vitamina D tras la cirugía bariátrica: 1) La deficiencia de vitamina D antes de la intervención quirúrgica. 2) La deficiencia en sales biliares asociada a los procedimientos de cirugía bariátrica (la absorción de vitamina D requiere la presencia de sales biliares). 3) Una inadecuada suplementación de vitamina D tras la cirugía. 4) Malabsorción de vitamina D en algunos casos debido a problemas de crecimiento bacteriano aumentado en el intestino (81).

En el estudio de los pacientes con obesidad mórbida, a pesar de haber disminuido el número de individuos con hiperparatiroidismo secundario después de la cirugía, un total de 22 pacientes seguían teniendo un valor de PTH > 70 pg/ml, de los cuales 14 tenían un nivel de 25 (OH) vitamina D < 24 ng/ml, lo que podría justificar el hiperparatiroidismo secundario. Pero en nuestro grupo, el número de pacientes con niveles de PTH elevados desciende después de la operación, posiblemente porque muchos normalizan sus niveles de vitamina D. De hecho, después de la cirugía bariátrica, encontramos una correlación más estrecha entre los niveles de PTH y vitamina D (la p varía de < 0,042 a < 0,006 antes y después de la cirugía) (Tabla 10 y 11). Otro hecho que presenta gran interés es la correlación observada entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y los niveles de hematocrito y hemoglobina en nuestros pacientes después de la cirugía ($p < 0,062$ y $p < 0,022$ respectivamente) (Tabla 11). Correlación que se discutió ampliamente en el apartado 5.2. correspondiente a "Correlación de los niveles de vitamina D con los principales parámetros bioquímicos en pacientes con insuficiencia renal en estadio V" (Tabla 7) y que también dio lugar a una reciente publicación de nuestro equipo (117).

Autores como Switzer et al (84) han realizado una revisión sistemática de la

bibliografía para ver si se mantenía el hiperparatiroidismo secundario a medio y largo plazo en los pacientes después de una cirugía de *bypass* gástrico en "Y de Roux". Estudiaron 14 trabajos que incluían a 2.680 mujeres y llegaron a la conclusión de que los niveles de PTH suben gradualmente en 5 años y los niveles de 25 (OH) vitamina D caen gradualmente hasta niveles de $20,5 \pm 4$ ng/ml y $20,7 \pm 3,8$ ng/ml en intervalos de 2-5 años, y después de 5 años post-cirugía. Sin embargo en nuestros resultados observamos una mejoría de éstos parámetros al año de la cirugía.

No hay duda de la asociación entre obesidad y deficiencia de vitamina D. A pesar de ello, en un trabajo realizado por Peterson et al (118) en 265 candidatos a cirugía bariátrica se observó que en muchos pacientes no se habían estudiado los niveles de vitamina D, lo que supone un alto riesgo para estos pacientes, ya que tampoco fueron tratados. En nuestro trabajo sólo se incluyeron 88 pacientes, porque al estudiar los pacientes operados entre 2010 y 2015, de los 180 que había, sólo se encontraron los niveles de 25 (OH) vitamina D antes y al año de la cirugía en 88. Además, de éstos 88, muy pocos habían sido tratados, aunque tuvieran la 25 (OH) vitamina D baja. Es importante tener en cuenta que la obesidad puede conducir a un cierto grado de inflamación crónica a través de la activación de varias vías metabólicas que elevan la síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias (85) y que la vitamina D tiene propiedades anti-inflamatorias actuando sobre algunos tipos de células inmunes (83). Los individuos obesos con déficit de vitamina D tienen más riesgo de complicaciones post-operatorias, particularmente una cicatrización retrasada y aumento de las infecciones debido al papel de la vitamina D en la re-epitelización y en la inmunidad. Por ello, determinar el estatus de vitamina D en los candidatos a cirugía bariátrica y corregirlo a ser posible, puede reportar grandes beneficios a los pacientes (119). Se acepta, en general, que se deberían conseguir unos niveles de 25 (OH) vitamina D de 30 ng/ml antes de la cirugía.

Un problema añadido es que no se ha llegado a un consenso general sobre el tratamiento adecuado con vitamina D en los pacientes obesos. Chakhtoura et al (83) en un reciente trabajo repasan varias guías de práctica clínica americanas y europeas para ver las recomendaciones en cuanto a dosis y tiempo de tratamiento con vitamina D en el pre y post-operatorio de la cirugía bariátrica, llegando a la conclusión de que las recomendaciones entre las Sociedades Médicas sobre la suplementación de vitamina D en la cirugía bariátrica difieren entre sí. Por ello, estos autores recomiendan que se realicen ensayos clínicos bien diseñados para obtener un estándar único y bien

protocolizado.

5.4. COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS DE MEDIDA DE 25 (OH) VITAMINA D UTILIZADAS ACTUALMENTE EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

En el estudio sobre la comparación de dos métodos de determinación de niveles de 25 (OH) vitamina D en 1.000 sueros, ambos métodos presentan una buena correlación entre ellos, siendo los valores obtenidos en el analizador CENTAURO® aproximadamente un 10% inferiores a los obtenidos por el analizador LUMIPULSE G1200®.

La correlación de ambos inmunoensayos con la técnica de referencia LC-MS/MS es buena (aunque más alta para LUMIPULSE® que para CENTAURO®), lo cual no excluye que los dos métodos infraestimen considerablemente los resultados de 25 (OH) vitamina D con respecto al patrón-oro (figura 14). En la selección de muestras, que se realizó escogiendo aquéllas donde la discrepancia entre ambos métodos era mayor, LUMIPULSE G1200® infraestima los valores en un 20%, mientras que CENTAURO® arroja valores de 25 (OH) vitamina D un 42% inferiores a los del método de referencia LC-MS/MS (figuras 15-18). Esta diferencia entre ambos inmunoensayos viene dada por la diferente técnica utilizada (ensayo competitivo en SIEMENS y no competitivo tipo sándwich en FUJIREBIO), el pretratamiento de la muestra para separar la 25 (OH) vitamina D de la VDPB y los anticuerpos seleccionados.

En la actualidad, según los estudios realizados, más de la mitad de la población mundial presenta niveles insuficientes o incluso franca deficiencia de vitamina D. Esto puede llegar a considerarse una “epidemia” mundial, pero habría que preguntarse si este estado de hipovitaminosis generalizada está influido en gran parte por la metodología de análisis utilizada en la determinación de las concentraciones de 25 (OH) vitamina D (35, 120).

Todas las casas comerciales que tienen ensayos de vitamina D, los tienen acreditados por el “*CDC Vitamin D standarization certification program*”, llevado a cabo por el Clinical Chemistry Branch, Division of Laboratory Sciences (Atlanta). Este laboratorio prepara 40 muestras de suero humano de concentración conocida y se las

cede al correspondiente laboratorio para que estandarice con estas muestras su método. Posteriormente, una vez al año, envían al laboratorio otras 40 muestras cuya concentración desconoce dicho laboratorio para que las analice y de acuerdo con los resultados les dan o no una certificación de calidad.

Aunque todos los laboratorios comerciales están incluidos en el *CDC vitamin D standardization program*, no todos estandarizan su método con estas muestras, aunque todos participan posteriormente en los análisis anuales de las muestras desconocidas con el fin de conseguir la certificación de calidad.

La situación es que tenemos laboratorios que estandarizan su técnica con las muestras del *CDC program*, otros frente al gases/masas y un tercer grupo que lo hace frente a los estándares del NIST, estos últimos son el verdadero patrón-oro de las muestras de 25 (OH) vitamina D.

La realidad es que, a pesar de que todos los laboratorios tienen la certificación de calidad del CDC Certification Program, los resultados que luego ofrecen de los pacientes ofrecen diferencias importantes, como acabamos de ver al comparar los métodos de Siemens y Fujirebio.

A nivel general, y a pesar de los diferentes esfuerzos realizados para conseguir una homogeneización de los resultados de la 25 (OH) vitamina D por parte de los diferentes laboratorios, queda mucho trabajo por hacer. Posiblemente, en primer lugar sería necesario que la estandarización de todos los métodos de los laboratorios se realizara con los controles del NIST. Después habría que comprobar cómo influyen en los resultados las diferentes formas de separación de la proteína ligadora y la especificidad de los anticuerpos utilizados a la hora de analizar los sueros de los pacientes, y hacer un esfuerzo a nivel internacional para que los resultados de la 25 (OH) vitamina D fueran lo más homogéneos posible (121, 122).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El valor de 25 (OH) vitamina D en nuestro estudio que maximiza especificidad y sensibilidad para elevar la PTH por encima de 70 pg/ml (límite superior de la normalidad) es 24 ng/ml.

2. Existe una estrecha relación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D de los pacientes con insuficiencia renal estadio V, en hemodiálisis, y sus niveles de Hemoglobina, Hematocrito, Hierro, Índice de Saturación e Hierro y Ferritina. Es decir, que existe una correlación estrecha entre los valores de 25 (OH) vitamina D y el grado de anemia de estos pacientes.

Además existe una correlación, ya bien conocida con los niveles de Ca, P y Albúmina.

Esto nos hace concluir que si tratamos a los pacientes con vitamina D, aumentando los niveles de la misma, podríamos conseguir disminuir el grado de anemia, reduciendo entonces, el tratamiento con eritropoyetina.

3. Existe una estrecha asociación entre el déficit de vitamina D y la obesidad mórbida, que se mantiene después de la cirugía bariátrica a no ser que se introduzca un tratamiento adecuado de vitamina D.

Asociado a este déficit de vitamina D existe un hiperparatiroidismo secundario, que se mantiene después de la cirugía bariátrica si los niveles de vitamina D no mejoran.

Ante estos resultados nos parece de extraordinaria importancia estudiar los niveles de vitamina D en pacientes con obesidad mórbida tanto antes como después de la cirugía bariátrica y proceder a su tratamiento en caso de ser necesario.

4. La comparación entre los resultados de 25 (OH) vitamina D aportados por el método ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) y por el método Analizador LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO) muestran que a pesar de que ambos están aceptados por el "*CDC Vitamin D Standardization Certification Program*" presentan diferencias importantes en los resultados. Por lo que se impone una mejor estandarización de los métodos de acuerdo con los estándares de la NIST (NATIONAL

5. A la vista de los resultados se puede establecer que el mantenimiento de unos niveles adecuados de 25 (OH) vitamina D es fundamental para tener unos niveles adecuados de PTH en la población general y, de modo especial, en los pacientes afectados de obesidad mórbida, así como para disminuir el grado de anemia de los pacientes con insuficiencia renal. Siendo por tanto importante solicitar en los análisis clínicos de éstos pacientes (tanto a nivel ambulatorio como hospitalario) la determinación de 25 (OH) vitamina D, para realizar un tratamiento, si los niveles son deficientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Quesada JM, González Domínguez. Vitamina D: de factor nutricional a hormona multifactorial. Editado por: Quesada JM. Ediciones del Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba 1994; 83-94 y 104-112.
2. Holick MF. Vitamin D: Molecular biology, physiology and clinical applications. Editors: Holick MF Totowa, Humana Press. 2010.
3. Rapado Errazti A, Díaz Curiel M. Hipovitaminosis D en España. Editado por Rapado A, Díaz M. Monografía de Fondo Editorial de la FHOEMO 7(Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas). Madrid 2000; 1-13, 15-26.
4. de la Piedra C, Pascual Gómez E, Rodríguez Valverde V, et al. Fisiología del metabolismo fosfo-cálcico. En: Tratado de Reumatología. Editado por. Pascual E, Rodríguez V, Carbonell J, Gómez-Reino JJ. Arán Ediciones, Madrid 1998; 1875-1897. Figuras 8 y 9, pag. 1886.
5. Delmiro Magdalena A. Vitamina D, calcitriol. AEBM XIII Jornada interhospitalaria "Metabolismo fósforo-calcio". 2008 febrero. Hospital Universitario 12 de Octubre. Servicio de Bioquímica Clínica.
6. Traba ML, de la Piedra C, Babé M, et al. Vitamina D: metabolismo, acciones y estados patológicos. Roche, Madrid 1987; 13-29.
7. Mawer EB, Backhouse J, Holman Ga, et al. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. Clin sci. 1972; 43: 413-431.
8. De Luca HF. Vitamin D metabolism and function. Monographs on Endocrinology. Springer-Verlay, Berlin, Heidelberg, New York 1977; 13: 11.
9. Rojas-Rivera J, de La Piedra C, et al. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. Nephrol Dial Transplant. 2010; 25: 2850-2865.

10. Holick MF, M.D, Ph.D. Vitamin Deficiency. Medical Progress. N Engl J Med.2007; 357: 266-81.
11. Zuluaga Espinosa NA, Alfaro Velásquez JM, et al. Vitamina D: nuevos paradigmas. Medicina y laboratorio. 2011; 17: 211-246.
12. Dusso AS, Brown AJ, Saltopolsky E. Vitamin D. AM J Physiol Ren Physiol. 2005; 289: F8-28.
13. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J et al. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. J Am Soc Nephrol 2010; 21: 353-361.
14. Andress DL. Vitamin D in chronic Kidney disease: a systemic role for selective vitamin receptor activation. Kidney Int. 2006; 69: 33-43.
15. Artaza JN, Mehrotra R, Norris KC. Vitamin D and the cardiovascular system. Clin J Am Soc Nephrol. 2009; 4: 1515-1522.
16. Zittermann A, Schleithoff S, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. Curr Opin Lipidol. 2007; 18: 41-46.
17. Hewison M, Freeman L, Hughes SV et al. Differential regulation of vitamina D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. J Immunol. 2003; 170: 5382-5390.
18. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of toleragenic dendritic cells and regulatory T cells. Semin Immunol. 2004; 16: 1127-1134.
19. Adori L. Intervention in autoimmunity: the potencial of vitamin D receptors agonist. Cell Immunol. 2005; 233: 115-124.
20. Tai K, Need AG, Horowitz M et al. Vitamin D, glucose, insulin and insulin sensitivity. Nutrition. 2008; 24: 279-285.
21. Quesada JM. Pathogenic role of vitamin D deficiency. Calcif Tissue Int. 1998. 63: 529-543.

22. Binderup L, Binderup E, Godtsfredsen WA. Development of new vitamin D analogs. En Vitamin D. Feldman D, Glorieux FH y Pike J, ed Riverside, Academic Press. 1997; 1027-1043.
23. Spiro A, Buttriss JL Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. Nutr Bull. 2014; 39: 322-350.
24. Holick MF. Vitamin S and health: evolution, biologic functions, and recommended dietary intakes for vitamin D. Vitamin D physiology, molecular biology, and clinical aplicaciones, 2nd edition. Boson: Humana Press. 2010; 3-33.
25. Chaouy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Evalence of Vitamin D insufficiency in adults normal population. Osteoporosis Int. 1997; 7: 439-443.
26. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, et al. Vitamin D: a pleiotropic hormone.Kidney Int. 2010; 78: 140-145.
27. Lips P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. J Steroid Biochem Mol Biol. 2007; 103: 620-625.
28. Alexiou K. The Dietary Importance of Vitamin D in Lifespan of Adulthood. MOJ Food process Technol.2016; 2: 00025. Doi: 10.15406/mojfpt.2016.02.00025.
29. Wahl DA, Cooper C, Ebeling PR, et al. A global representation of vitamin D status in healthy populations. Archives of osteoporosis. 2012; 7: 155–172.
30. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96: 1911-1930.
31. Ofenloch-Haehnle B. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - immunoassays. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2012; 243: 50-53.
32. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2011; 57: 441-448.

33. Kobold U. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012; 243: 54-59.
34. Thienpont LM, Stepman HC, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012; 243: 41-49.
35. Ibrahim F, Parmentier C, Boudou P. Divergence in classification of 25-hydroxyvitamin D status with respect to immunoassays. *Clin Chem.* 2007; 53: 363-364.
36. Phinney KW. Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 511-512.
37. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids.* 2010; 75: 477-88.
38. Prince RL. Hiperparatiroidismo secundario y terciario. En: *Manual sobre las enfermedades óseas metabólicas y trastornos del metabolismo mineral*, 6th, Favus MJ.(Ed: ASBMR, 2006. p. 191.Graphic 73157 Version 3.0).
39. Muñoz-Torres M, Sosa Henríquez M. Situación actual de los niveles de vitamina D en la población española. *Rev Esp Enfer Metab Óseas.* 2005; 14: 17-20.
40. Van Schoor NM, Lips P. Worldwide vitamin D status: Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011; 25: 671-680.
41. Lips P, Duong T, Oleksik A, et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes for raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1212-1221.
42. Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effect of age and serum 25-OH vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: 3989-3995.

43. Garg MK, Tandon N, Marwaha RK, et al. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D, parathormone and bone mineral density in Indian population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014; 80: 41-46.
44. Kushnir MM, Ray JA, Rockwood AL, Roberts WL, et al. Rapid analysis of 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Association of Vitamin D and Parathyroid Hormone Concentrations in Healthy Adults. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134: 148-156.
45. Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, et al. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem*. 2012; 45: 326-330.
46. Binkley N, Krueger DC, Morgan S, et al. Current status of clinical 25-Hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. *Clin Chim Acta*. 2010; 411: 1976-1982.
47. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 3152-3157.
48. Barake M, Daher RT, Salti I, et al. 25-Hydroxyvitamin D assay variations and impact on clinical decision making. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: 835-843.
49. Hruska KA, Mathew S. Chronic Kidney Disease Mineral Bone Disorder (CKD-MBD). En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Seven Edition. Editor CJ Rosen. American Society of Bone and Mineral Research, Washington 2009; 343-349.
50. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85: 1586-1591.
51. Marazuela M. Déficit de vitamina D en el adulto: Clínica, diagnóstico y tratamiento. *Endocrinol Nutr*. 2005; 52: 215-223.
52. Shoji T, Nishizawa Y. Chronic kidney disease (CKD) and bone. Pleiotropic actions of vitamin D and survival advantage. *Clin Calcium*. 2009; 19: 514-521.

53. Hewison M, Burke F, Evans KN et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103: 316-321.
54. Clayton P, Singer R. 25-Hydroxyvitamin D levels in prevalent Australian dialysis patients. *Nephrology.* 2009: 554-559.
55. Krasniak A, Drozd M, Pasowicz M et al. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 515-521.
56. Organización Mundial de la salud [Internet] Obesidad y Sobrepeso. Nota descriptiva N°311. Junio de 2016. Centro de prensa. Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
57. Hetherington MM, Cecil JE. Gene-environment interactions in obesity. *Forum Nutr.* 2010; 63: 195-203.
58. Must A, Spadano J, Coakley EH et al. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 1999; 282: 1523-1529.
59. Ng M, Fleming T, Robinson M et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014; 384: 766-781.
60. Rodríguez-Rodríguez E, López-Plaza B, López-Sobaler AM, et al. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos españoles. *Nutr Hosp.* 2011; 26: 355-363.
61. Low S, Chin MC, Deurenberg-Yap M. Review on Epidemic of Obesity. *Ann Acad Med Singapore.* 2009; 38: 57-59.
62. Ministerio de Sanidad y Política Social. Disponible en (último acceso 31/05/10): <http://www.msc.es/gabinetePrensa/notaPrensa/desarrolloNotaPrensa.jsp?id=635>. España, 2006.
63. Poddar M, Chetty Y, Chetty VT. How does obesity affect the endocrine system?. A narrative review. *Clin Obes.* 2017; 7: 136–144.

64. Yao Y, Zhu L, He I, Duan Y, Liang W, Nie Z et al. A metaanalysis of the relationship between vitamin D deficiency and obesity. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 14977-14984.
65. Pereira Santos M, Costa PR, Assis AM. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015; 16: 341-349.
66. Savastano S, Barrea L, Savanelli MC, et al. Low vitamin D status and obesity: role of nutritionist. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18: 215–225.
67. Durá-travé T, Gallinas-Victoriano F, Chueca-Guindulain MJ, et al. Prevalence of hipovitaminosis D and associated factors in obese Spanish Children. *Nutr Diabetes*. 2017; 7: e248.
68. Rontoyani VG, Aila JC, Kaul S, et al. Association between obesity and serum 25(OH)D concentrations in older Mexican adults. *Nutrients*. 2017; 9: E97.
69. Dasarathy J, Periyalwar P, Allampati S, et al. Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2014; 34: e118–e127.
70. Jeonghoon Ha, Kwanhoon Jo, et al. Parathyroid hormone and vitamin D are associated with the risk of metabolic obesity in a middle-aged and older Korean population with preserved renal function: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2017; 12: e0175132.
71. Barchetta I, De Bernardinis M, Capoccia D, et al. Hypovitaminosis D is independently associated with metabolic syndrome in obese patients. *PLoS One*. 2013; 8: e68689.
72. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest*. 1985; 76: 370–373.
73. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014; 156: 20–44.
74. Abbas MA. Physiological functions of vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 165: 369-381.
75. Ding C, Gao D, Wilding J, et al. Vitamin D signaling in adipose tissue. *Br J Nutr*. 2012; 108: 1915-1923.
76. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008; 33: 90–94.

77. Wong KE, Kong J, Zhang W, et al. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem*. 2011; 286: 33804–33810.
78. Li J, Byrne ME, Chang E, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008; 112: 122–126.
79. Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, et al. 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One*. 2012; 7: e52171.
80. Sabench F, Domínguez-Adame E, Ibarzabal A, et al. Criterios de calidad en cirugía bariátrica: revisión de conjunto y recomendaciones de la Asociación Española de Cirujanos y de la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad. *Cir Esp*. 2017; 95: 4-15.
81. Koch TR, Finelli FC. Postoperative metabolic and nutritional complications of bariatric surgery. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010; 39: 109-124.
82. Lespessailles E, Tuomi H. Vitamin d alteration associated with obesity and bariatric surgery. *Experimental Biology and Medicine*. 2017; 10: 1-9.
83. Chakhtoura MT, Nakhoul NN, Shawwa K, Antzoros C, El Haij Fuleihan GA. Hypovitaminosis D in bariatric surgery: a systematic review of observational studies. *Metabolism*. 2016; 65: 574-585.
84. Switzer NJ, Marcil G, Prasad S, Debru E, Church N, Mitchell P et al. Long-term hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism outcomes of the Roux-EN-Y-gastric bypass: a systematic review. *Obes Rev*. 2017; 18: 560-566.
85. Pannu PK, Calton EK, Soares MJ. Calcium and vitamin D in obesity and related chronic disease. *Adv Food Nutr Res*. 2016; 77: 57-100.
86. Obispo Entrnas A, Legupin Tubio D, Lucena Navarro F, et al. Relationship between vitamin d deficiency and the components of metabolic syndrome in patients with morbid obesity, before and 1 year after laparoscopic Roux-en-Y-gastric bypass or sleeve gastrectomy. *Obes Surg*. 2017; 27: 1222–1228.

87. Peterson LA, Zeng X, Caufield-Noll CP, Schweitzer MA, et al. Vitamin D status and supplementation before and after bariatric surgery: a comprehensive literature review. *Surg Obes Relat Dis*. 2016; 12: 693-702.
88. Hawkins F. La vitamina D y el hueso. *Rev Esp Enf Metab Óseas*. 2007; 16: 45-47.
89. Gómez, García-Algar O, Mur Sierra A, et al. Concentraciones plasmáticas de 25-OH vitamina D y paratohormona en sangre de cordón umbilical. *Rev Esp Salud Pública*. 2015; 89: 75-83.
90. Kiss Z, Ambrus C, Almasi C, et al. Serum 25(OH)-cholecalciferol concentration is associated with hemoglobin level and eritropoyetin resistance in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron Clin Prac*. 2011; 117: c373-c378.
91. Ertük S, Kutlai S, Karabulut HG, et al. The impact of vitaminD receptor genotype on the management of anemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40: 816-823.
92. Blair D, Byham-Gray L, Lewis E, McCaffrey S. Prevalence of vitamin D deficiency and effects of supplementation with ergocalciferol in stage 5 chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr*. 2008; 18: 375-382.
93. Naini AE, Hedaiaati ZP, Gholami D, et al. The effect of vitamin D administration on treatment of anemia in end-stage renal disease patients with vitamin D deficiency on hemodialysis: a placebo-controlled double-blind clinical trial. *J Res Med Sci*. 2015; 20:-745-750.
94. Kumar VA, Kujubu DA, Sim JJ, Rasgon SA, Yang PS. Vitamin D supplementation and recombinant human erythropoietin utilization in vitamin D-deficient hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2011; 24: 98-115.
95. Patel NM, Gutierrez OM, Andress DL, Coyne DW, Levin A, Wolf M. Vitamin D deficiency and anemia in early chronic kidney disease. *Kidney International*. 2010; 77: 715-720.

96. Rianthavorn P, Boonyapapong P. Ergocalciferol decreases erythropoietin resistance in children with chronic kidney disease stage 5. *Pediatr Nephrol*. 2013; 28: 1261-1266.
97. Riccio E, Sabbatini M, Bruzzese D, Capuano I, Migliaccio S, Andreucci M et al. Effect of paricalcitol vs calcitriol on hemoglobin levels in chronic kidney disease patients: a randomized trial. *PLoS One*. 2015; 10: e0118174.
98. Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, Mazzaferro S, Ruso R, Cozzolino M. Renal anemia and EPO hiporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28: 1672-1679.
99. Davis SL, Littlewood TJ. The investigation and treatment of secondary anemia. *Blood Rev*. 2012; 26: 65-71.
100. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-hydroxyvitaminD deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2009; 30: 64-72.
101. Nagaku M, Eckardt KU. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol*. 2006; 26: 261-268.
102. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med*. 1989; 320: 980-991.
103. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006; 147: 5542-5548.
104. Sim J, Lac PT, Liu ILA, Megerditchian SO, Kumar V, Kujubu DA et al. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol*. 2010; 89: 447-452.
105. Lac PT, Choi K, Liu IA, Megerditchian S, Rasgon SA, Sim JJ. The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. *Clinical Nephrology*. 2010; 74: 25-32.

106. Babit JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010; 55: 726-741.
107. Brancaccio D, Cozzolino M, Gallieni M. Hyperparathyroidism and anemia in uremic subjects: a combined therapeutic approach. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: S21-S24.
108. Lotto A, Teramoto M, Cheung M, Becker K, Sukumar D. Serum parathyroid hormone responses to vitamin D supplementation in overweight/obese adults: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrients.* 2017; 9: E241.
109. Hypönen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45Y: Nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 860-868.
110. Di Nisio A, De Toni L, Savobic I, Rocca MT, De Filippis V, Opocher G et al. Impaired release of vitamin d in dysfunctional adipose tissue: new question vitamin D supplementation in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 2564-2574.
111. Stein EM, Strain G, Sinha N, Ortiz D, Pomp A, Dakin G et al. Vitamin d insufficiency prior to bariatric surgery: risk factors and a pilot treatment study. *Clin Endocrinol.* 2009; 71: 176-83.
112. Williams SE, Cooper K, Richmond, Schauer P. Perioperative management of bariatric surgery patients. Focus on metabolic bone disease. *Clev Clin J Med.* 2008; 75: 333-349.
113. Ryden M, Backdahl J, Petrus P, Thorell A, Gao H, Coue M et al. Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. *Int J Obes.* 2016; 40: 714-720.
114. Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY. Insulin disrupts beta-adrenergic signaling to protein kinase A in adipocytes. *Nature.* 2005; 437: 569-573.
115. López-Ramiro E, Rubert M, Mahillo I, De la Piedra C. Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral.* 2016; 8: 55-60.

116. Hultin H,Edfeldt K, Sundborn M, Hellman P. Left-shifted relation between calcium and parathyroid hormone in obesity. *JClin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 3973-3981.
117. López-Ramiro E, Rubert M, Gonzalez-Parra E, et al. Correlations between levels of 25-hidroxi-vitamin D and degree of anemia in patients with chronic kidney disease. *Americ Jour of Clin & Exp Med*. 2017; 5: 145-150.
118. Peterson LA, Cheskin LJ, Schweitzer MA, Magnuson TH, Steele KE. Treatment for vitamin D deficiency prior to bariatric surgery: a prospective cohort study. *Obes Surg*. 2016; 26: 1146-1149.
119. Peterson LA. Bariatric surgery and VitaminD: key messages for surgeons and clinicians before and after bariatric surgery. *Minerva Chir*. 2016; 71: 322-336.
120. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006, 81: 353-373.
121. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotopedilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010; 82: 1942-1948.
122. VDSCP: Vitamin D Standardization-Certification Program. <https://www.cdc.gov/labstandards/vdscp.html>

**PUBLICACIONES A LAS QUE
HA DADO LUGAR**

López-Ramiro E¹, Rubert M¹, Mahillo F, de la Piedra C²

¹ Laboratorio de Bioquímica Investigación

² Departamento de Epidemiología

IIS Fundación Jiménez Díaz - Madrid (España)

Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D

Correspondencia: Concha de la Piedra - Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)
Correo electrónico: cpiedra@fjd.es

Fecha de recepción: 22/11/2015

Fecha de aceptación: 16/03/2016

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 33º Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011)

Resumen

Introducción: Cada vez está más demostrado el papel de la vitamina D en múltiples patologías, una de ellas el desarrollo de un hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. Los métodos de laboratorio de cuantificación de vitamina D en suero no estaban bien estandarizados hasta ahora, por lo que no podía establecerse con certeza a partir de qué niveles de vitamina D se producían determinadas anomalías como la elevación de la PTH. Nuestro estudio pretende determinar por debajo de qué niveles de vitamina D nos encontraremos con niveles de PTH anormalmente elevados, realizando la determinación de vitamina D en el laboratorio con una técnica debidamente estandarizada y fiable.

Métodos: El estudio descriptivo y retrospectivo se realizó con pacientes mayores de 18 años en los que se hicieron simultáneamente determinaciones de PTH, 25(OH) vitamina D (25OHD) y que además tuvieran valores normales de calcio, filtrado glomerular y fósforo. Para la determinación de vitamina D se utilizó un método de electroquimioluminiscencia estandarizado con respecto a la técnica de gases-masas. Por el programa estadístico Stata versión 11 se calculó el valor de 25OHD para el que la PTH se elevaba por encima de 70 pg/ml con la mayor sensibilidad y especificidad.

Resultados: Se incluyeron 4.083 pacientes, de los que 2.858 eran mujeres (70%) y 1.225 (30%) varones. La edad media de la población estudiada fue 60,60 años (desviación estándar, 15,29). El 74% de la población tenía una PTH en suero por debajo de 70 pg/ml (valores considerados normales) y el 26% mayor de 70 pg/ml. Al construir la curva de ROC de los niveles de 25OHD, en función de valores de PTH por debajo o por encima de 70 pg/ml, el área bajo la curva fue 0,5962 ($p < 0,0001$). El punto de corte teniendo en cuenta conjuntamente la sensibilidad y la especificidad que determinaban los valores de vitamina D para predecir los valores de PTH por encima de 70 pg/ml fue 24 ng/ml. De los pacientes con PTH normal, el 71% tenían valores de vitamina D normales, mientras que, de los pacientes con PTH elevada (mayor de 70 pg/ml), casi la mitad presentaban una vitamina D menor de 24 ng/ml, porcentaje que aumentaba según se iba elevando la PTH.

Conclusiones: El valor de 25OHD que muestra una mejor especificidad y sensibilidad para predecir valores anormalmente elevados de PTH es 24 ng/ml, valor superior al presentado en trabajos anteriores (alrededor de 18 ng/ml).

Con los resultados de este estudio, realizado con un método debidamente calibrado, se puede decir que el 44,9% de pacientes con valores de vitamina D menores de 24 ng/ml presenta niveles de PTH anormalmente elevados, con una función renal normal y valores de calcio y fósforo normales. Este porcentaje es menor entre los 18 y 40 años (24%) y llega al 49% por encima de los 60 años. Estos pacientes podrían tratarse con vitamina D para evitar un posible hiperparatiroidismo secundario al déficit de dicha vitamina. Es importante tener en cuenta que el método de determinación de vitamina D utilizado debe estar debidamente estandarizado con respecto al método de gases-masas.

Palabras clave: hiperparatiroidismo secundario, déficit de vitamina D, vitamin D standardization program, espectrometría tandem-masas, 25(OH) vitamina D.

Secondary hyperparathyroidism due to vitamin D deficiency

Summary

Introduction: Vitamin D is increasingly recognized as playing a significant role in combatting many diseases. One is the development of secondary hyperthyroidism due vitamin D deficiency. To date, laboratory quantification methods of serum vitamin D were not well standardized, so precise levels vitamin D certain abnormalities occurred such as raised PTH could not be established with certainty. The present study was aimed at determining below what vitamin D levels we will find abnormally high levels of PTH, carrying out the vitamin D determination in the laboratory with a standardized, reliable technique.

Methods: This descriptive, retrospective study was conducted with patients over 18 years in which determinations were made simultaneously with PTH, 25 (OH) vitamin D (25OHD) and which also have normal values of calcium, glomerular filtration rate and phosphorus.

For determining vitamin D, standardized electrochemiluminescence method was used with gas chromatography-mass spectrometry. Using the Stava version 11 statistical program, the 25OHD was calculated where PTH value was above 70 pg/ml with greater sensitivity and specificity.

Results: In all, 4,083 patients were included, of whom 2,858 were women (70%) and 1,225 (30%) males. The mean age of the study population was 60.60 years (standard deviation, 15.29). 74% of the population had a serum PTH under 70 pg/ml (normal values) and 26% were 70 percent greater pg/ml. By constructing the ROC curve levels of 25OHD, depending on PTH values below or above 70 pg/ml, the area under the curve was 0.5962 ($p < 0.0001$). The cut having jointly account the sensitivity and specificity that determined vitamin D levels to predict PTH values above 70 pg / ml was 24 ng / ml. Of the patients with normal PTH, 71% presented normal vitamin D values, while patients with elevated PTH (Greater than 70 pg/ml), almost half had a vitamin D below 24 ng / ml, which increased as the PTH percentage was elevated.

Conclusions: The 25OHD value shows better specificity and sensitivity to predict abnormally high PTH is 24 ng / ml, which is higher than the level reported in previous work, (about 18 ng / ml) value. The results of this study, carried out with an appropriately calibrated method, showed that 44.9% of patients with vitamin D values of less than 24 ng/ml PTH had abnormally high levels, with a normal value of calcium and phosphorus and normal renal function. This percentage is less in those individuals between 18 and 40 years (24%) and reaches 49% beyond 60 years. These patients could be treated with vitamin D to prevent possible secondary hyperparathyroidism due to vitamin deficiency. It is noteworthy that the method of determining vitamin D used must be properly standardized with respect to gas chromatography-tandem mass spectrometry method.

Key words: *secondary hyperparathyroidism, vitamin D deficiency, vitamin D standardization program, tandem-mass spectrometry, 25 (OH) vitamin D.*

Introducción

La vitamina D interviene en el metabolismo del fósforo y del calcio. La deficiencia de vitamina D está asociada a osteoporosis y osteomalacia en adultos y a raquitismo en niños. Recientes estudios también han demostrado su papel en enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.^{1,4}

La PTH es una hormona secretada por la glándula paratiroidea, que interviene en el metabolismo del calcio, obteniéndolo del hueso si hay hipocalcemia, y aumentando la producción de 1,25(OH)₂ vitamina D en el riñón, para favorecer la absorción del calcio. Por otra parte, también aumenta la reabsorción tubular de calcio. En el laboratorio clínico con frecuencia encontramos cifras de PTH más elevadas que el límite superior de la normalidad, aunque con valores normales de creatinina o filtración glomerular, calcio y fósforo y que, por tanto, no se corresponden con un hiperparatiroidismo primario o secundario, dato que desconcierta al clínico. En muchos de

estos casos, el aumento de PTH va asociado a déficit de vitamina D, hecho cada vez más constatado en nuestra población y al que no se le ha prestado demasiada atención⁵⁻³⁰. Los niveles de vitamina D se miden a través de los niveles del metabolito 25(OH) vitamina D (25OHD), que expresan el estatus de dicha vitamina en los pacientes³¹. Hasta fecha reciente, la mayoría de las determinaciones de 25OHD no estaban convenientemente estandarizadas y los valores variaban mucho con los distintos métodos³².

Por otra parte, resulta de gran interés conocer a partir de qué niveles de 25OHD se produce una elevación anormal de la PTH, pudiendo descartar otras causas probables de ese hiperparatiroidismo³³.

Diversos estudios muestran una variación considerable entre los resultados de 25OHD obtenidos en el laboratorio por métodos diferentes: radio-inmunoensayo, electroquimioluminiscencia, HPLC y espectrometría tandem-masas^{33,34-36}. La variabilidad entre los métodos de los laboratorios

conduce a una mala asignación de los pacientes¹⁷, así como a una falta de estándares a la hora de aplicar una política sanitaria¹⁸. Todo esto dificulta establecer los niveles de vitamina D considerados normales y a partir de los que es probable que se produzca una subida anormal de PTH.

Debido a esto se ha puesto en marcha un programa de estandarización internacional (*Vitamin D Standardization Program*), en colaboración entre el NIH-ODS (*National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements*), los centros de Control de las Enfermedades y Prevención (CDP) y el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). Esto ha dado lugar a la aparición de unos calibradores de referencia a disposición de los fabricantes de modo que los valores obtenidos sean los mismos para todos los métodos^{12,18}. Los calibradores de referencia están validados frente a la técnica de cromatografía líquido/tándem-masas, que sin duda es la más exacta de las existentes.

El objetivo de este estudio es determinar el valor de 25OHD por debajo del cual se produce un aumento anormal de valores de PTH. Resulta importante utilizar un método de determinación de 25OHD debidamente estandarizado con respecto al método gases masas, que es el patrón oro, dado que la mayor parte de los trabajos publicados hasta ahora en la literatura están hechos con métodos de determinación de 25OHD no debidamente estandarizados.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo transversal retrospectivo llevado a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid).

Se analizaron de manera consecutiva todos los análisis de los pacientes a los que se les había pedido PTH, 25OHD, Ca y filtrado glomerular (FG) simultáneamente, durante el periodo de mayo del 2012 a noviembre de 2012 en dicho hospital.

En el estudio se incluyeron, de todos los pacientes analizados, sólo aquellos mayores de 18 años con FG mayor de 60 y valores séricos de calcio entre 8,4 mg/dl y 10,5 mg/dl simultáneamente. Por lo tanto, quedaron excluidos todos los pacientes con insuficiencia renal y valores anormales de calcio, para descartar un hiperparatiroidismo primario o secundario a insuficiencia renal.

Se creó una base de datos que contenía a todos los pacientes codificados en la que se recogían sus diferentes variables en estudio (edad, sexo, y parámetros analíticos), obtenidos de manera manual a través de los datos del laboratorio clínico del Hospital Fundación Jiménez Díaz.

Este estudio fue autorizado por el Comité Ético del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz. Dado que los datos fueron extraídos de una base de datos general del laboratorio de Bioquímica, sin tener nunca en cuenta el nombre de los pacientes, no ha sido

necesario obtener un consentimiento informado de los mismos.

La determinación de PTH se realizó por electroquimioluminiscencia en un aparato automático ADVIA CENTAUR (SIEMENS). Se consideraron anormales niveles de PTH mayores de 70 pg/ml. El rango de referencia proporcionado por la casa comercial es de 14-70 pg/ml. Al igual que los restantes métodos de segunda generación, éste mide la hormona intacta 1-84, con la interferencia cruzada de la PTH truncada a nivel amino-terminal. La sensibilidad del método es de 5 pmol/ml y los coeficientes de variación intra e inter-análisis son <7% y <10%, respectivamente.

La determinación de 25OHD se realizó por electroquimioluminiscencia en un autoanalizador Isys (IDS, UK), método de determinación de la vitamina debidamente estandarizado con respecto al método de gases-masas. La sensibilidad del método es de 4 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter-análisis son <5% y <7%, respectivamente.

Por el programa estadístico Stata versión 11 se calculó el valor de 25OHD por el que la PTH se elevaba más de 70 pg/ml con una sensibilidad y especificidad mayor, calculando el área bajo la curva ROC y comprobando que fuera estadísticamente significativa.

Se realizó también un análisis descriptivo de la muestra calculando el porcentaje de hombres y mujeres, la edad media y mediana. También se calcularon los porcentajes de pacientes con PTH por encima y por debajo de 70 pg/ml y los porcentajes de pacientes con 25OHD con diferentes valores (pacientes con vitamina D menores de 10, de 10 a menor de 24, de 24 a menor de 30 y pacientes con valores mayores de 30).

Se describieron las diferencias entre la población con PTH mayor y menor de 70 pg/ml mediante las pruebas de t de Student, Mann-Whitney y Chi-cuadrado.

Resultados

Se estudiaron un total de 9.225 pacientes, de los cuales 5.142 quedaron excluidos por ser menores de edad, tener insuficiencia renal o presentar valores anormales de calcio. Por lo tanto, sólo se incluyeron en el estudio un total de 4.083 pacientes, 2.858 mujeres (70%) y 1.225 (30%) varones, todos de edad superior a 18 años.

La edad media de la población fue 60,60 años con una desviación estándar de 15,29, y la mediana de la edad fue 62 años. La edad mínima fue de 18 años y la edad máxima de 100 años. El 74% de la población tenía una PTH por debajo o igual a 70 pg/ml (valores considerados normales) y el 26% mayor de 70 pg/ml. Los datos demográficos de los pacientes se encuentran reflejados en la tabla 1.

Con respecto a los niveles de 25OHD de nuestra población, sólo el 46,4% de la misma presentaba niveles de este metabolito superiores a 30 ng/ml, un 20,9% presentaba niveles entre 24 y 30 ng/ml, un 30% entre 10 y 23 ng/ml, y un 2,7% niveles ≤ 10 ng/ml (Figura 2).

Tabla 1. Datos demográficos y valores medios y mediana de PTH y 25(OH) vitamina D en una población de 4.083 pacientes, 2.858 mujeres y 1.225 varones, todos de edad ≥ 18 años

	Media	DS	P25	P75	Mediana
Edad (años)	60,69	15,29	51	72	62
PTH (pg/ml)	57,36	38,11	35,50	71,05	50,30
Vit D (ng/ml)	30,70	14,52	21	37	29

Tabla 2. Comparación de las medias de edad, calcio, 25-OH vitamina D, PTH y número de mujeres y varones según tengan valores de PTH mayores de 70 pg/ml, o menores o iguales a 70 pg/ml en una población de 4.083 pacientes, 2.848 mujeres y 1.225 varones

	PTH ≤ 70		PTH > 70		
Variable	Media	DS	Media	DS	Valor P
Edad (años)	59,3	15,5	64,6	12,9	$<0,0001$
Calcio (mg/dl)	9,57	3,80	9,52	4,10	0,7231
Vit D25 (ng/ml)	31,8	14,3	27,6	14,6	$<0,0001$
PTH (pg/ml)	42,5	15,3	99,8	50,0	$<0,0001$
	N		N		
Mujer	2,123		735		
Varón	900		325		

En la descripción basal de la muestra no había diferencias clínicamente significativas en cuanto a valores de PTH dependiendo del sexo (Tabla 2). Sin embargo, sí hay diferencia significativa de edad entre los pacientes con valores normales y anormales de PTH ($59,3 \pm 15,5$ años *vs.* $64,6 \pm 13,9$ años, $p < 0,001$), siendo de más edad los pacientes con PTH anormal y presentando, además, valores de 25OHD significativamente menores que los del grupo con PTH normal (Tabla 2).

Con los datos de los pacientes construimos la curva ROC de los niveles de 25OHD en función de tener valores de PTH por debajo o por encima de 70 pg/ml. Se obtuvo un área bajo la curva de 0,5962 ($p < 0,0001$), que nos demuestra que existe una relación entre 25OHD y PTH (Figura 1).

Al utilizar los valores de vitamina D para predecir valores de PTH por encima de 70 pg/ml, el mejor punto de corte teniendo en cuenta conjuntamente sensibilidad y especificidad fue 24 ng/ml (Figura 1).

En nuestra población, se halló que un 32,7% de la muestra presentaba unos valores de vitamina D menores de 24 ng/ml, de los cuales un 44,9% tenían valores de PTH mayores de 70 pmol/ml. Al dividir a los pacientes en 3 grupos de edad: de 18 a 40 años, entre 40 y 60 años y mayores de 60, se observó un hecho notable. En el grupo entre 18 y 24 años, de los pacientes con 25OHD menor de 24 ng/ml, sólo un 24% presentaban valores de PTH > 70 pg/ml. Entre los pacientes de 40-60 años,

el 33,7% de los pacientes con niveles bajos de 25OHD presentaban un valor elevado de PTH. Y en el grupo de pacientes de más edad (mayores de 60 años), llega a ser un 49% el grupo de pacientes con PTH > 70 pg/ml y 25OHD < 25 ng/ml. Es decir, que a medida que va siendo más avanzada la edad, la probabilidad de que un nivel de 25OHD bajo produzca una cifra elevada de PTH es mayor. No existe el mismo riesgo en todas las edades. Es también interesante destacar que, en nuestro trabajo, el porcentaje de pacientes con 25OHD < 24 ng/ml es el 32,7%, y son similares los porcentajes en los distintos rangos de edad: 33,2%, 31,7% y 32%, respectivamente. Es decir, en nuestra población no encontramos que exista un mayor porcentaje de pacientes con niveles de 25OHD bajos entre los mayores de 60 años.

Discusión

Nuestro trabajo muestra una asociación inversa entre niveles séricos de 25OHD y PTH. Otros autores han observado esta correlación^{19,21}.

El valor de 25OHD que maximiza especificidad y sensibilidad, en cuanto a producir un aumento anormal de PTH, es de 24 ng/ml, valor superior al presentado en trabajos anteriores, que se encontraba alrededor de 18 ng/ml²².

Dado que este estudio corrobora el hecho de que un déficit de vitamina D puede producir una elevación anormal de los valores de PTH, consideramos importante, en la práctica clínica, determi-

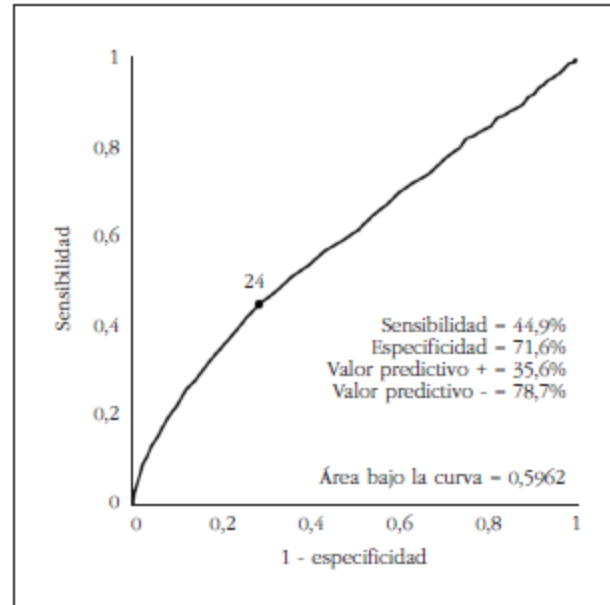
nar los niveles de 25OHD en aquellos pacientes en que se hallen valores de PTH anormalmente altos sin causa aparente, para descartar un hiperparatiroidismo secundario a un déficit de vitamina D. Este hecho podría corregirse suplementando a los pacientes con la vitamina de D necesaria, evitando así el agravamiento de enfermedades producidas por la elevación de la PTH, como es el caso de la osteoporosis⁹.

El problema de los estudios realizados hasta la actualidad es que se han utilizado diferentes métodos de determinación de 25OHD no debidamente estandarizados, por lo que había una gran variación entre los resultados de 25(OH)D obtenidos, y era difícil establecer los niveles de vitamina D considerados normales y a partir de los cuales era probable que se produjera un aumento anormal de PTH. Las diferentes técnicas de laboratorio utilizadas para determinar la vitamina D son: radio-inmunoensayo, electroquimioluminiscencia, HPLC o cromografía lipídica y espectrometría tandem-masas. Actualmente la técnica que se considera más correcta es la de cromatografía líquido/tándem-masas, que sin dudas es la más exacta de las existentes¹¹ y hay calibradores de referencia validados frente a esta técnica. En este estudio se ha utilizado electroquimioluminiscencia en un autoanalizador Isys (IDS, UK), debidamente estandarizado con respecto gases-masas, por lo que los resultados obtenidos se consideran válidos, y comparables a los estudios realizados con otros métodos que estén bien calibrados.

En la mayoría de los estudios realizados sobre la vitamina D hasta la fecha no se discute el método utilizado, ni se especifica si el método está calibrado con respecto a la técnica de gases-masas, lo que no permite saber si los resultados de los valores de vitamina D hallados en los estudios son correctos y si se podrían extrapolar a la población general y podrían ser aplicados a la práctica clínica una vez que el clínico encuentra unos determinados valores en los análisis clínicos de sus pacientes.

En un grupo de mujeres postmenopáusicas, Capatina *et al.*²³ observaron que el 27,2% de los casos con deficiencia de vitamina D presentaban hiperparatiroidismo secundario, porcentaje menor que el encontrado por nosotros, el 44,9%. Laroche *et al.*²⁴ observaron que el 13% de pacientes con 25OHD <30 ng/ml presentaban hiperparatiroidismo secundario. Sin embargo, Sadat Ali *et al.*²⁵

Figura 1. Curva ROC obtenida al relacionar los valores de PTH y 25(OH) vitamina D en una población de 4.083 pacientes, 2.858 mujeres y 1.225 hombres, de edad ≥ 18 años, con calcio y fósforo normales y sin insuficiencia renal. En la parte inferior se muestra el número de pacientes con niveles de 25(OH) vitamina D mayores o iguales a 24 ng/ml y menores de 24 ng/ml, y con PTH mayor y menor o igual a 70 pg/ml

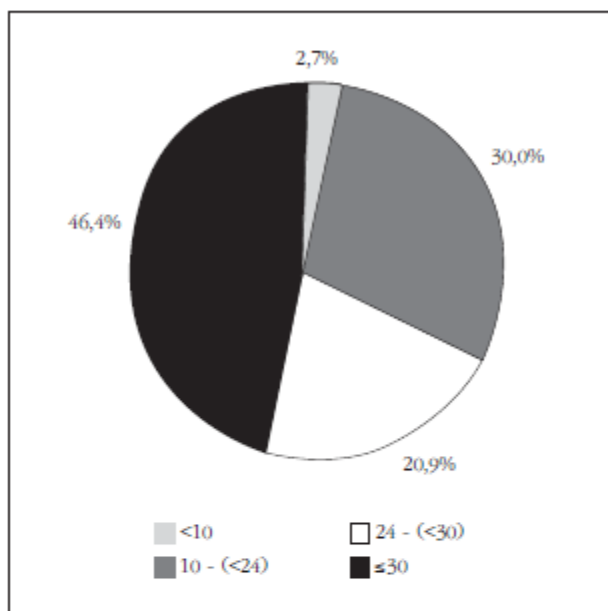


Vit D (ng/ml)	PTH (pg/ml)	
	≤ 70	> 70
< 24	860	476
≥ 24	2.163	584

encontraron en 200 pacientes (150 mujeres y 50 hombres entre 18 y 69 años) que todos los pacientes con deficiencia de vitamina D, cuya determinación se había realizado por gases-masas, presentaban hiperparatiroidismo secundario.

Como hemos mencionado anteriormente, los resultados de este estudio, realizado con un método debidamente calibrado, muestran que un 44,9% de pacientes con niveles de 25OHD <24 ng/ml presentaban valores de PTH en suero > 70 pg/ml, sin otras causas que lo justifiquen. Este porcentaje es menor en la población entre 18 y 40 años, y mayor en la población > 60 años. Parece, por tanto, importante que el clínico trate con suplementos de vitamina D a aquellos pacientes con niveles de 25OHD <24 ng/ml en orden a evitar un posible hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. Para poder establecer un punto de corte, es importante que los métodos de determinación de 25OHD estén debidamente estandarizados con respecto a la técnica de gases-masas.

Figura 2. Grupos de pacientes con valores de 25(OH) vitamina D menores de 10 ng/ml, entre 10 y 24 ng/ml, entre 24 y 30 ng/ml y mayores de 30 ng/ml, de una población de 4.083 pacientes, 2.858 mujeres y 1.225 hombres, de edad ≥ 18 años, con calcio y fósforo normales y sin insuficiencia renal



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses

Bibliografía

- Quesada Gómez JM, Navarro Valverde C. Niveles inadecuados de vitamina D: no es una D-liciosa perspectiva. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2013;5:65-6.
- Shoji T, Nishizawa Y. Chronic kidney disease (CKD) and bone. Pleiotropic actions of vitamin D and survival advantage. *Clin Calcium*. 2009;19:514-21.
- Rubert M, Montero M, De la Piedra C. Niveles muy descendidos de 25(OH) vit D en pacientes sometidos a cirugía bariátrica. *Rev Esp Enfer Metab Óseas*. 2007;16:103.
- Rojas Rivera J, De la Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:2850-65.
- Muñoz-Torres M, Sosa Henríquez M. Situación actual de los niveles de vitamina D en la población española. *Rev Esp Enfer Metab Óseas*. 2005;14 (Supl.1):17-20.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
- Van Schoor NM, Lips P. Worldwide vitamin D status: Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25:671-80.
- Lips P, Duong T, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D, et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes for raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1212-21.
- Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effect of age and serum 25-OH vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:3989-95.
- Garg MK, Tandon N, Marwaha RK, et al. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D, parathyroid hormone and bone mineral density in Indian population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80:41-6.
- Odenkoven-Haehle B. Approaches to measurement of Vitamin D concentrations-Immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:50-3.
- Thienpont LM, Stepan CM, Vesper HW. Standardization measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:41-9.
- Ortíz-Gómez S, García-Algar O, Mur Sierra A, Ferrer Costa R, Carrascosa Lezcano A, Yeste Fernández D. Concentraciones plasmáticas de 25-OH vitamina D y parathormona en sangre de cordón umbilical. *Rev Esp Salud Pública*. 2015;89:75-83.
- Kushnir MM, Ray JA, Rockwood AL, Roberts WL, La'ulu SL, Whittington JE, et al. Rapid analysis of 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Association of Vitamin D and Parathyroid Hormone Concentrations in Healthy Adults. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:148-56.
- Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM, et al. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem*. 2012;45:326-30.
- Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D. Current status of clinical 25-Hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1976-82.
- Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3152-7.
- Barake M, Daher RT, Salti I, Cortas NK, Al-Shaar L, Habib RH, et al. 25-Hydroxyvitamin D assay variations and impact on clinical decision making. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:835-43.
- Zhang Q, Shi L, Peng N, Xu S, Zhang M, Zhang S, et al. Serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and its association with bone mineral density and serum parathyroid hormone levels during winter in urban males from Gulian, Southwest China. *Br J Nutr*. 2016;4:1-7.
- Olmos JM, Hernández JL, García Velasco P, Martínez J, Ilorca J, González-Macias J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporosis Int*. 2016;27:105-13.
- El Badawy AA, Abosera MM, El Seifi OS, Mortada EM, Bakry HM, Waly EH, et al. Vitamin D, parathyroid hormone and associated minerals among students in Zagazig district, Sharkia Governorate, Egypt. *Int J Vitam Nutr Res*. 2014;84:3-4.
- Hawkins F. La vitamina D y el hueso. *Rev Esp Enf Metab Óseas*. 2007;16:45-7.
- Capatina C, Carsote M, Caragheorghieopol A, Polana C, Berteanu M. Vitamin D deficiency in postmenopausal women- biological correlates. *Maedica (Buchar)*. 2014;9:316-22.
- Laroche M, Nilon D, Gennero I, Lassoued S, Pouillies JM, Trémolieres F, et al. Vitamin D deficiency prediction by patient questionnaire and secondary hyperparathyroidism in a cohort of 526 healthy subjects in their fifties. *Presse Med*. 2015;44(7-8):e283-90.
- Sadat-Alli M, Al-Omran AS, Al-Turki HA. Parathyroid glands response to low vitamin D levels in healthy adults: a cross-sectional study. *Ulster Med J*. 2015;84:26-9.

Torrubia B¹, Alonso I¹, López-Ramiro E¹, Mahillo F, De la Piedra C¹

¹ Laboratorio de Bioquímica

² Servicio de Epidemiología

Fundación Jiménez Díaz - Madrid (España)

Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH) vitamina D

Correspondencia: Concha de la Piedra - Laboratorio de Bioquímica - Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)
Correo electrónico: cpiedra@fjd.es

Fecha de recepción: 23/12/2015

Fecha de aceptación: 16/03/2016

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 34º Congreso de la ASBMR (Minneapolis, 2013).

Resumen

Introducción: La cuantificación de 25(OH) vitamina D total en sangre es el marcador más preciso del estado de vitamina D en un individuo. La técnica patrón-oro para su medición es la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), aunque actualmente los laboratorios clínicos utilizan de rutina técnicas de quimioluminiscencia. El objetivo del estudio fue comparar las concentraciones de 25(OH) vitamina D obtenidas mediante dos métodos automatizados comerciales y estudiar la correlación de dichos métodos con la técnica de referencia LC-MS/MS.

Material y método: Se cuantificaron los niveles de 25(OH) vitamina D en 1.000 muestras de suero del laboratorio de Bioquímica de la Fundación Jiménez Díaz mediante 2 métodos automatizados comerciales por detección de quimioluminiscencia: ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) y LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO). Entre todas las muestras analizadas, las 50 más discordantes entre sí se enviaron para ser evaluadas por la técnica de referencia LC-MS/MS.

Resultados: Los resultados obtenidos indican que existe una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932), siendo los valores de LUMIPULSE® G1200 un 10% superiores a los de CENTAURO®. Con respecto a las 50 muestras seleccionadas, podemos observar que existe una buena correlación entre los dos inmunoensayos con la técnica LC-MS/MS, aunque ambos métodos infraestiman considerablemente los resultados de 25(OH) vitamina D con respecto al patrón-oro.

Discusión: Aunque ambas técnicas son adecuadas para su utilización, habría que plantearse si la "epidemia" mundial de hipovitaminosis D se debe a la metodología de análisis utilizada. Esta variabilidad entre inmunoensayos se solucionaría estandarizando las diferentes técnicas comerciales con los materiales de referencia elaborados por el NIST.

Palabras clave: 25(OH) vitamina D, FUJIREBIO, SIEMENS, comparación técnica, LC-MS/MS.



Comparison between two automated chemiluminescence immunoassays for quantifying 25 (OH) vitamin D

Summary

Introduction: Quantifying total blood 25 (OH) vitamin D is the most accurate marker of an individual's vitamin D status. The gold standard technique for measurement is liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), although currently clinical laboratories tend to use chemiluminescence techniques. The objective of this study was to compare 25 (OH) vitamin D concentrations obtained by two commercially-produced automated methods and study the correlation of these methods with the LC-MS/MS reference technique.

Material and methods: The 25(OH) vitamin D levels were quantified in 1,000 serum samples from the Jimenez Diaz Biochemistry Foundation Laboratory using 2 automated methods for chemiluminescence detection: ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) and LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio). Among all the samples tested, the 50 most discordant to each other were sent to be evaluated by LC-MS/MS reference technique.

Results: The results indicate that there is good correlation between the two methods: CCI=0.923 (0.914-0.932), with the G1200 LUMIPULSE® values 10% being higher than CENTAURO®. Regarding the 50 samples selected, we can see that there is a good correlation between the two immunoassays with LC-MS/MS, although both methods significantly underestimate 25 (OH) vitamin D results with respect to the gold standard.

Discussion: Although both techniques are suitable for use, it is worth considering whether the worldwide vitamin D deficiency epidemic is due to the analysis methodology used. This variability between immunoassays could be solved by standardizing the different commercial techniques in line with NIST-produced reference materials.

Key words: 25(OH) vitamin D, Fujirebio, SIEMENS, technical comparison, LC-MS/MS.

Introducción

La vitamina D es una vitamina liposoluble implicada en el metabolismo fosforocálcico cuyo papel es fundamental en la formación y mineralización ósea. Actualmente, se han demostrado además sus acciones inmunomoduladoras, antiproliferativas y estimuladoras de la diferenciación celular que la relacionan con importantes patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer^{1,2}.

La cuantificación de 25(OH) vitamina D total en sangre es el marcador más preciso del estado de vitamina D en un individuo, aunque su metabolito activo es la 1,25(OH)₂ vitamina D^{3,4}.

La técnica patrón-oro para su medición es la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), pero actualmente los laboratorios clínicos utilizan de rutina inmunoensayos por quimioluminiscencia⁵.

Los principales problemas de dichos inmunoensayos se deben a la naturaleza hidrofóbica del analito, la alta concentración en la que se encuentra la proteína ligadora de vitamina D (VDPB) en el suero, y la existencia de reacciones cruzadas de los múltiples metabolitos de vitamina D con los anticuerpos utilizados en la técnica. Por ello, un correcto inmunoensayo requiere un pretratamiento para inactivar la VDPB, una selección cuidadosa del anticuerpo utilizado y la estandarización de la técnica frente a los valores arrojados por el analizador LC-MS/MS. Las diferentes técnicas comerciales para el análisis de vitamina D difieren en la manera de separar la proteína ligadora, en el porcentaje de reacciones cruzadas con otros metabolitos de nuestro analito, así como en la especificidad del anticuerpo utilizado^{6,7}.

Actualmente, como resultado del conocimiento general sobre la severa deficiencia de vitamina D en

la población mundial, ha surgido la necesidad de medir los niveles de vitamina D en diferentes poblaciones, cohortes de investigación y pacientes individuales⁸. Diversos estudios han mostrado variaciones considerables entre los diversos métodos analíticos basados en inmunquímica, cromatografía líquida/UV y LC-MS/MS. Se ha llegado a afirmar que un paciente concreto puede ser clasificado con niveles de suficiencia o insuficiencia de vitamina D dependiendo del laboratorio donde se haya realizado el análisis⁹.

Para solucionar este problema se ha establecido la necesidad de la estandarización de los niveles de 25(OH) vitamina D por parte de numerosas organizaciones científicas. En 2011, la Oficina de Suplementos Dietéticos (ODS) del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH) en colaboración con el *National Institute of Standards and Technology* (NIST) creó el programa de estandarización de la vitamina D (VDSP). El NIST ha desarrollado 4 materiales de referencia basados en suero con diferentes concentraciones conocidas de vitamina D que permiten estandarizar las diversas técnicas comerciales¹⁰. A pesar de ello, no todos los métodos actuales empleados para cuantificar 25(OH) vitamina D están ya calibrados frente a estos estándares¹¹.

El objetivo de este estudio fue comparar las concentraciones de 25(OH) vitamina D obtenidas mediante dos métodos automatizados comerciales y estudiar la correlación de dichos métodos con la técnica LC-MS/MS.

Material y métodos

Para ello hemos utilizado 1.000 muestras de suero elegidas al azar entre las analizadas en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz. Las muestras pertenecían a pacientes con una edad

comprendida entre 1 y 92 años (59 ± 18 , media \pm DE) con un 37% de mujeres y un 63% de hombres. Se cuantificaron los niveles de 25(OH) vitamina D en el analizador ADVIA CENTAURO XP® (SIEMENS) y en el LUMIPULSE G1200 (FUJIREBIO).

En todos los casos las muestras se han manejado de modo anónimo, por lo que no ha sido necesaria la obtención del consentimiento informado de los pacientes.

El analizador LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO) realiza un inmunoensayo no competitivo tipo sándwich con detección por quimioluminiscencia que emplea dos anticuerpos, un anticuerpo monoclonal de oveja que se une a la 25(OH) vitamina D₂ y D₃, y un segundo anticuerpo monoclonal que se une exclusivamente al complejo anteriormente formado. La separación de la proteína ligadora de la vitamina D se realiza mediante un agente químico en 1ª reacción.

Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión intraensayo con un coeficiente de variación (CV) $\leq 6\%$, y una sensibilidad funcional de 3,491 ng/mL. Su intervalo de medición es de 4-150 ng/mL. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es del 100% para la 25(OH) vitamina D₃, del 100,1% para la 25(OH) vitamina D₂, y del 19,9% para el epímero C3 de 25(OH) vitamina D₃.

El analizador ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) consiste en un inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia que utiliza un anticuerpo monoclonal murino anti-fluoresceína unido de forma covalente a partículas paramagnéticas (PMP), un anticuerpo monoclonal murino anti-25(OH) vitamina D marcado con éster de acridinio, y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína. Como medio de separación de la proteína ligadora se utiliza un agente liberador en tampón salino.

Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión intraensayo con un CV del 4,2%-11,9% y una sensibilidad funcional de 4,2 ng/mL. Su intervalo de medición es de 4,2-150 ng/mL. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es del 97,4% para la 25(OH) vitamina D₃, del 106,2% para la 25(OH) vitamina D₂ y del 1% para el epímero C3 de 25(OH) vitamina D₃.

Entre todas las muestras analizadas, las 50 más discordantes entre sí se enviaron para ser evaluadas por el método LC-MS/MS en el laboratorio del Dr. Etienne Cavalier (Departamento de Química Clínica, Universidad de Lieja, Bélgica); con el fin de comparar los dos inmunoensayos por quimioluminiscencia con respecto a la técnica de referencia LC-MS/MS. La diferencia de resultado entre estas 50 muestras oscilaba entre el 14% y el 133% ($32 \pm 52\%$, media \pm DE) con respecto a la media de los 2 valores obtenidos. En todos los casos este porcentaje era superior a los coeficientes de variación inter-análisis de los 2 métodos: FUJIREBIO, 6%; SIEMENS, 11,9%. Analizamos las muestras más discordantes para ver si correspondían a un grupo determinado de pacientes, como por ejemplo gestantes que presentan niveles anormales de proteína ligadora de la vitamina D. Sin embargo, observamos que dichos pacientes pertenecían mayo-

ritariamente a los servicios de Nefrología, Reumatología y Endocrinología, hecho no significativo, ya que estos servicios son los que más demandan la determinación de vitamina D. Por otra parte, la edad media de estos 50 pacientes era 63 ± 16 años, siendo el 34% hombres y el 66% mujeres, cifras muy similares a las del grupo total de 1.000 muestras (edad 59 ± 18 años con un 37% de mujeres y un 63% de hombres). Se eligieron las muestras más discordantes entre sí para enviar a analizar por gases-masas porque nuestro objetivo era doble: por una parte comprobar su similitud con la técnica de gases-masas y por otra parte aclarar cuál de las dos técnicas se asemejaba más a la técnica de referencia. Este segundo punto no se podía clarificar si enviábamos las muestras cuyos resultados eran similares. Con respecto a la elección de un número de 50 muestras como la adecuada para el estudio, se realizó porque era una cantidad de muestras suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos. Debido al elevado coste de la determinación por gases-masas no fue posible enviar un mayor número de muestras.

Resultados

Evalúamos el grado de concordancia de las medidas de vitamina D proporcionadas por los dos aparatos: ADVIA CENTAURO XP® y LUMIPULSE G1200®. Para ello, calculamos los coeficientes de correlación intraclass (CCI) junto con sus intervalos de confianza al 95%. Los resultados obtenidos indican que existe una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932). No existen diferencias significativas en el CCI si se dividen las muestras en los grupos con valores de vitamina D ≤ 20 ng/mL y > 20 ng/mL.

La recta de regresión obtenida entre ambos ensayos fue $Y=1,221+1,035X$, donde Y corresponde a los valores de LUMIPULSE G1200 y X a los del CENTAURO®. Se observa que los valores de LUMIPULSE G1200 son un 10% superiores a los de CENTAURO® (Figura 1).

Con respecto al subgrupo de 50 muestras seleccionadas para analizar por LC-MS/MS, se ha obtenido un CCI=0,987 con el analizador LUMIPULSE y un CCI=0,938 con el analizador CENTAURO®. Aunque ambos son satisfactorios, el coeficiente de correlación intraclass más elevado es el de LUMIPULSE, por tanto, las mediciones de este aparato se parecen más a las exactas (Figuras 2 y 3).

A continuación, con nuestro subgrupo de 50 muestras seleccionadas, realizamos las gráficas de Bland-Altman, donde el eje X corresponde a las medias de cada par de observaciones y el eje Y a las diferencias entre cada par de observaciones. En los gráficos hay dos líneas continuas horizontales. La línea continua gris está trazada a la altura del valor cero; si las medidas dadas por el aparato fueran idénticas a las medidas exactas los puntos debería situarse justo en esta línea. La línea continua azul representa la media de las diferencias. Si esta línea está por debajo de la línea del valor 0 quiere decir que el aparato tiende a dar medidas inferiores al valor exacto, y si está por encima lo contrario.

Como podemos observar en la figura 4, la media de las diferencias entre el analizador LUMIPULSE

Figura 1. Recta de regresión entre LUMIPULSE G1200* (FUJIREBIO) y CENTAURO* (SIEMENS) utilizando 1.000 muestras de suero de pacientes de la Fundación Jiménez Díaz

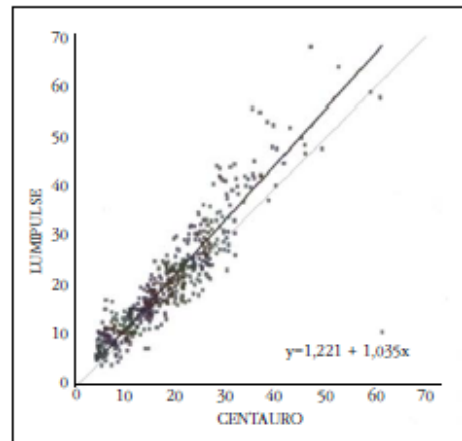
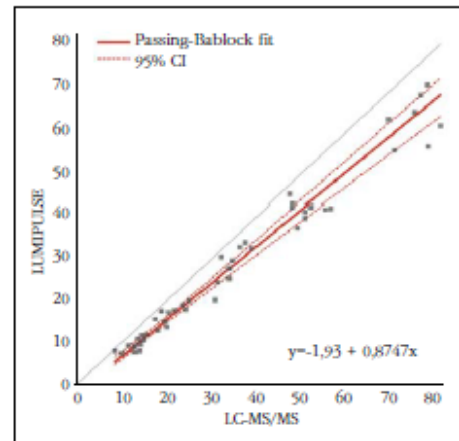


Figura 2. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre LUMIPULSE G1200* (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



G1200 y el método de referencia LC-MS/MS es de un 20%; por tanto, dicho inmunoensayo infraestima los valores de 25(OH) vitamina D en un 20% con respecto al patrón-oro. En la figura 5, apreciamos cómo en el caso del analizador CENTAURO* la media de las diferencias es de un 42%, por lo cual los valores que arroja esta técnica son muy inferiores a las del método de referencia. Por otro lado, la técnica LUMIPULSE G1200* presenta una menor dispersión en los resultados.

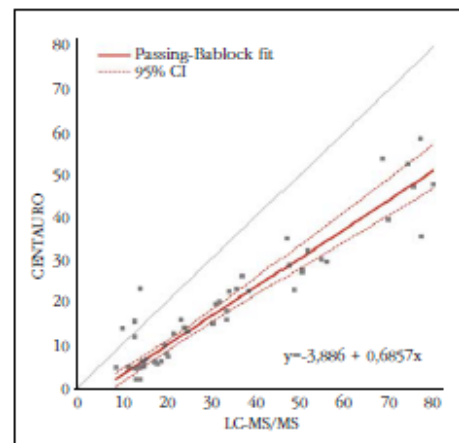
Discusión

Ambos métodos presentan una buena correlación entre ellos, siendo los valores obtenidos en el analizador CENTAURO* aproximadamente un 10% inferiores a los obtenidos por el analizador LUMIPULSE G1200*.

La correlación de ambos inmunoensayos con la técnica de referencia LC-MS/MS es buena (aunque más alta para LUMIPULSE que para CENTAURO), lo cual no excluye que los dos métodos infraestimen considerablemente los resultados de 25(OH) vitamina D con respecto al patrón-oro. En esta selección de muestras, que se realizó escogiendo aquellas donde la discrepancia entre ambos métodos fue mayor, LUMIPULSE G1200 infraestima los valores en un 20%, mientras que CENTAURO* arroja valores de 25(OH) vitamina D un 42% inferiores a los del método de referencia LC-MS/MS. Esta diferencia entre ambos inmunoensayos viene dada por la diferente técnica utilizada (ensayo competitivo en SIEMENS y no competitivo tipo sándwich en FUJIREBIO), el pretratamiento de la muestra para separar la 25(OH) vitamina D de la VDPB y los anticuerpos seleccionados.

En la actualidad, según los estudios realizados, más de la mitad de la población mundial presenta niveles insuficientes o incluso franca deficiencia de vitamina D³¹. Esto puede llegar a considerarse una "epidemia" mundial, pero habría que preguntarse si este estado de hipovitaminosis generalizada está

Figura 3. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre CENTAURO* (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



influido en gran parte por la metodología de análisis utilizada en la determinación de las concentraciones de 25(OH) vitamina D³¹.

Esta variabilidad entre inmunoensayos se solucionaría estandarizando las diferentes técnicas comerciales con los materiales de referencia para la medida de 25(OH) vitamina D elaborados por el NIST³².

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por Laboratorios Fujerbio Europe. Agradecemos de modo especial a Alicia Nadal sus comentarios y su colaboración durante el desarrollo del mismo.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Figura 4. Gráficas de Bland-Altman entre LUMIPULSE G1200* (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)

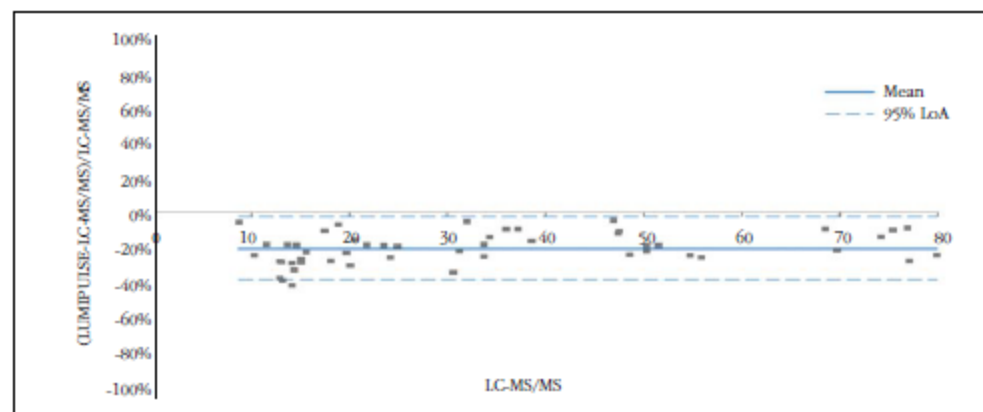
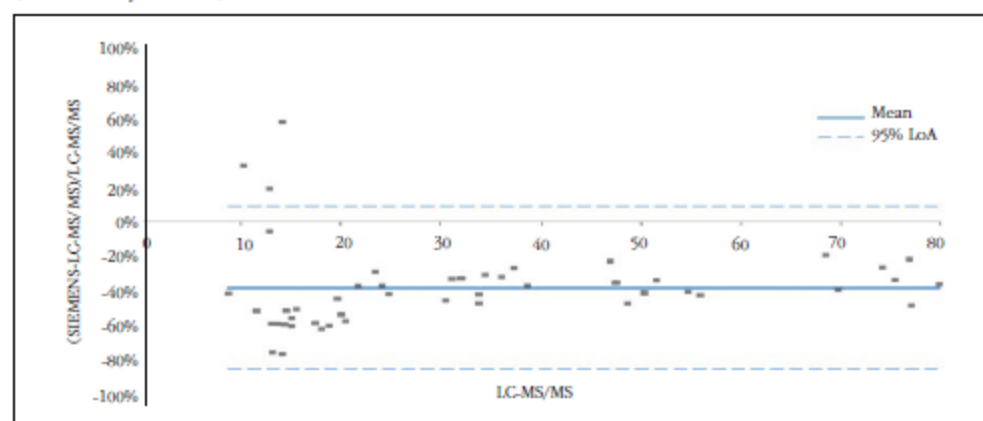


Figura 5. Gráficas de Bland-Altman entre CENTAURO* (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



Bibliografía

1. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido E. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(9):2850-65.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
3. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.
4. Ofenloch-Haehnle B. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - Immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:50-3.
5. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57(3):441-8.
6. Kobold U. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:54-9.
7. Thienpont LM, Stepman HC, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:41-9.
8. Ibrahim F, Parmentier C, Boudou P. Divergence in classification of 25-hydroxyvitamin D status with respect to immunoassays. *Clin Chem*. 2007;53(2):363-4.
9. Phinney KW. Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:511S-2S.
10. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. 2010;75(7):477-88.
11. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:353-73.
12. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010;82:1942-8.

Correlation Between Levels of 25-Hydroxy-Vitamin D and Degree of Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease

Elena López-Ramiro¹, Mercedes Rubert¹, Emilio González-Parra², Ignacio Mahillo³, Concepción de la Piedra^{1,*}

¹Biochemistry Laboratory, Sanitary Research Institute Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

²Nephrology, Sanitary Research Institute Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

³Epidemiology and Statistics, Sanitary Research Institute Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

Email address:

cpiedra@fjd.es (C. de la Piedra)

*Corresponding author

To cite this article:

Elena López-Ramiro, Mercedes Rubert, Emilio González-Parra, Ignacio Mahillo, Concepción de la Piedra. Correlation Between Levels of 25-Hydroxy-Vitamin D and Degree of Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. Vol. 5, No. 4, 2017, pp. 145-150. doi: 10.11648/j.ajcem.20170504.18

Received: May 16, 2017; Accepted: May 27, 2017; Published: July 18, 2017

Abstract: Introduction: Vitamin D exercises pleiotropic effects independently of calcium and phosphorous homeostasis. Purpose: To analyze the possible correlation between levels of 25-hydroxy vitamin D (25(OH)D) and other parameters of patients with chronic kidney disease (CKD). Patients and methods: One hundred and forty-five patients with stage-5 CKD were studied (mean age 65.9 ± 14.6 years; 74 males and 71 females; Levels of 25(OH)D, age, bone alkaline phosphatase, procollagen I amino-terminal propeptide, carboxyterminal telopeptide of collagen I, intact parathyroid hormone (PTH), bio-PTH, hemoglobin, hematocrit, urea, creatinine, total proteins, albumin, iron, iron saturation index, calcium, phosphorous, total alkaline phosphatase, serum CO_2 , cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, prealbumin, ferritin, proBNP, and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) were determined. Spearman's correlation coefficient and p values were analyzed. Results: This work show a positive correlation between levels of 25(OH)D and anemia (i.e., hemoglobin, hematocrit, iron, iron saturation index, and ferritin). Conclusion: These results show the close relationship between the degree of anemia in patients with CKD and 25(OH)D levels. It is of great importance to maintain levels of 25(OH)D in patients with advanced-stage CKD, as this can decrease anemia levels and, in turn, lower quantities of erythropoietin would be necessary to maintain hematocrit.

Keywords: Hemodialysis Patients, 25(OH) Vitamin D, Anemia

1. Introduction

In recent years there has been a renewed interest in the effects that vitamin D status exerts on health. Although the efficiency of vitamin D status has been classically associated with bone pathology, the discovery that almost all body tissues and cells have vitamin D receptors (VDR) and an enzyme system to synthesize $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) has evidenced that vitamin D carries out other functions such as inhibition of cellular proliferation, angiogenesis, and renin production, the stimulation of cellular maturation, and the regulation of immune response. For this reason, low levels of vitamin D are now associated with mortality, cancer, cardiovascular disease, autoimmune

diseases, diabetes, psychiatric illness, and even respiratory disease in addition to the previously known effects on bone metabolism (osteomalacia, secondary hyperparathyroidism, osteoporosis, and fractures [1, 2]).

In chronic renal disease in hemodialysis as many as 80% of patients present low concentrations of 25(OH) Vitamin D (25(OH)D) [3]. Besides the general causes producing low levels of vitamin D [4] in the population, in patients with renal disease, FGF-23 can produce an inactivation of 25(OH)D through the activation of 24-hydroxylase, which transforms it in $24, 25(\text{OH})_2$ Vitamin D [5]. The KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) guides recommended correcting this insufficiency by applying the strategies used in the general population [6]. In the first stage,

the nephrologist focuses treatment with vitamin D on the prevention or treatment of secondary hyperparathyroidism [7], without taking into account its auto/paracrine effects. However, more and more attention is now being given to the extra-renal role that vitamin D levels play in patients with CKD.

The aim of this work is to correlate 25(OH)D levels in a group of dialysis patients with those of 26 other important parameters, in order to determine the extent to which these parameters may be determined by vitamin D (levels of 25(OH)D) status.

2. Materials and Methods

One hundred and forty-five patients with stage-5 CKD were studied (mean age 65.9 ± 14.6 years; 74 males vs. 71 females; mean time of dialysis of 3 years (p25: 2 years, p75: 6 years)) were recruited from the Dialysis Unit of the Jiménez Díaz Foundation hospital in Madrid and studied prospectively and observationally. An 85.1% of patients were with any activator of the receptor of vitamin D, and 17.9% were receiving cinacalcet. The patient sample was the same studied in the work "Estudio de las diferentes formas de medida de parathormona sérica en el seguimiento del paciente en hemodiálisis. Influencia sobre la mortalidad. Importancia de las variaciones" by Laura Rodríguez-Osorio et al., *Nefrología*, doi: 10.1016/j.nefro.11.021. (Epub ahead of print)

This study was authorized by the Ethical Committee of the Jiménez Díaz Foundation hospital. Informed consent was not necessary due to anonymous handling of patient data.

The most exhaustive baseline study possible in all patients was conducted. Values of 25(OH)D ($D_2 + D_3$) were determined by electrochemiluminescence in an Elecsys autoanalyzer (Roche). Intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were $< 7.5\%$ and $< 8\%$, respectively. The sensitivity of the method was 3 ng/ml. PTH was measured by two different methods: one with second- and another of with third-generation assays. Values of intact-PTH (iPTH) or PTH obtained with second-generation assays were determined by electrochemiluminescence in the Elecsys autoanalyzer (Roche). This method uses an antibody directed against the aminoacids 26-32 of the molecule, and another that is directed against the 55-64 zone. Due to this fact, this method does not detect the carboxy-terminal fragments of the molecule, though it detects the PTH 1-84 and the fragments 7-84. Intra- and inter-assay CV were $< 2.5\%$ and $< 3\%$, respectively. The sensitivity of the method was 1.2 pg/ml. PTH values obtained from third-generation assays, PTH-bio, were determined by electrochemiluminescence in the Elecsys autoanalyzer (Roche). This method uses an antibody directed against the aminoacids 1-4 of the molecule, and another directed against the 55-64 zone, measuring only the molecule 1-84. Intra- and inter-assay CV were $< 3\%$ and $< 6\%$, respectively. The sensitivity of the method was 5.50 pg/ml. Hemoglobin and hematocrit were performed in an ADVIA 120 (Siemens). Hemoglobin is calculated by the

method of cyanmethemoglobin modified, that measures the absorbance in a flux cuvette by colorimetry at 546 nm. The hematocrit is mathematically calculated. Erythrocytes \times corpuscular mean volume/10. With the ADVIA CENTAUR 2400 autoanalyzer were determined the following parameters: serum albumin (bromocresol dye-binding method), intra- and inter-assay CV were $< 1.3\%$ and $< 2\%$, respectively. The sensitivity of the method was 1 g/dl; serum calcium (arsenazo III technique), intra- and inter-assay CV were $< 1.2\%$ and $< 2\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.5 mg/dl; serum creatinine (alkaline picric acid technique), intra- and inter-assay CV were $< 3.1\%$ and $< 4\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.2 mg/dl; serum inorganic phosphate (phosphomolybdate UV technique), intra- and inter-assay CV were $< 2.2\%$ and $< 3\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.3 mg/dl; serum total proteins (biuret technique), intra- and inter-assay CV were $< 1.3\%$ and $< 2\%$, respectively. The sensitivity of the method was 2 g/dl; C-reactive protein (PCR) (turbidimetric technique potentiated with latex), intra- and inter-assay CV were $< 4.9\%$ and $< 6\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.003 mg/dl; serum alkaline phosphatase (p-nitrophenol hydrolysis), intra- and inter-assay CV were $< 1.9\%$ and $< 2.4\%$, respectively. The sensitivity of the method was 5 U/l; serum urea (enzymatic reaction of Roch-Ramel, using urease and glutamate-dehydrogenase), intra- and inter-assay CV were $< 1.1\%$ and $< 1.9\%$, respectively. The sensitivity of the method was 4 mg/dl; Iron was determined by colorimetry (ferric iron is dissociated from its transporter protein and is reduced to ferrous form. This form a complex with ferrocene, producing a chromophore), intra- and inter-assay CV were $< 2.5\%$ and $< 2.9\%$, respectively. The sensitivity of the method was 2 μ g/dl; Ferritin (turbidimetric technique potentiated with latex), intra- and inter-assay CV were $< 4\%$ and $< 5\%$, respectively. The sensitivity of the method was 6.0 ng/ml; CO_2 was analyzed by an enzymatic assay (reaction between phosphoenolpyruvate-carboxylase of HCO_3^- with phosphoenolpyruvate to produce oxalacetate, intra- and inter-assay CV were $< 2.2\%$ and $< 3.2\%$, respectively. The sensitivity of the method was 5 mmol/l; Serum cholesterol was determined by an enzymatic assay, intra- and inter-assay CV were $< 0.7\%$ and $< 1.4\%$, respectively. The sensitivity of the method was 5 mg/dl; Triglycerides were determined by an enzymatic assay, intra- and inter-assay CV were $< 0.6\%$ and $< 2.5\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.1 mg/dl. Serum prealbumin was determined in an SPA plus autoanalyzer by means of turbidimetry. Intra- and inter-assay CV were $< 4.4\%$ and $< 6\%$, respectively. The sensitivity of the method was 0.006 g/l. ProBNP was determined in a VITROS 5600 autoanalyzer, by an immunoassay by quimioluminescence by MICROWELL technology, intra- and inter-assay CV were $< 3.5\%$ and $< 6.0\%$, respectively. The sensitivity of the method was 5 pg/ml; fibroblast growth factor 23 (FGF-23), C-terminal, was measured by an enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Immutopics, USA) using 2 polyclonal antibodies directed against the C-terminal

fraction of FGF-23. Intra- and inter-assay CV were < 1.7% and < 3.5%, respectively. The sensitivity of the method was 1.5 RU/ml. Bone isoenzyme of alkaline phosphatase was determined in serum by ELISA (Ostase BAP, IDS, UK). Intra- and inter-assay CV were < 4.5% and < 6.4%, respectively. The sensitivity of the method was 0.7 µg/l. Serum aminoterminal propeptide of procollagen I (PINP) and carboxyterminal telopeptide of collagen I (β-CTX) were measured by electrochemiluminescence in an Elecsys autoanalyzer (Roche). For PINP, intra- and inter-assay CV were < 2.9% and < 3.7%, respectively. The sensitivity of the method was 5 µg/l. For β-CTX, intra- and inter-assay CV were < 4.6% and < 4.7%, respectively. The sensitivity of the method was 0.07 ng/ml. Values of tweak were determined by ELISA (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Intra- and inter-assay CV were < 7.1% and < 8.3%, respectively. The sensitivity of the method was 10 pg/ml. Iron saturation index is a mathematic calculation: Serum iron x 100/ serum transferrin x 1.27.

3. Results

Table 1 shows demographic and clinical characteristics and analytical values of the studied population. Of the 145 patients, 23 presented levels of 25(OH)D that were lower than 10 ng/ml, 39 between 10 and 20 ng/ml, and 53 had values between 20 and 30 ng/ml. With respect to values of hemoglobin, 30 patients showed values < 11 ng/ml.

Table 1. Demographic and clinical characteristics and analytical values of a population of 145 patients in hemodialysis.

Variable	
Age (years)	65.9 ± 14.6
Time in hemodialysis (years)	Me 3 (P25-2, P75-6)
Male (%)	51
Hemodialysis technique (%)	
- Conventional	90
- On-Line	10
Hypertension (%)	86.9
Diabetes Mellitus (%)	23.4
Dyslipidemia (%)	35.2
	M ± DE
Hemoglobin (g/dl)	11.8 ± 1.6
Hematocrit (%)	35.5 ± 4.6
Urea (mg/dl)	117.7 ± 36.5
Total protein (g/dl)	6.5 ± 0.6
Albumin (g/dl)	3.6 ± 0.4
Iron (µg/dl)	65.4 ± 28
Iron saturation index (%)	31.7 ± 14.3
Calcium (mg/dl)	9.2 ± 0.7
Phosphorous (mg/dl)	4.7 ± 1.6
CO ₂	21.4 ± 3.5
Cholesterol (mg/dl)	158 ± 35
Prealbumin (mg/dl)	33 ± 10
Ferritin (ng/dl)	406 ± 242.1
Tweak (pg/ml)	319.2 ± 275.1
	Me (P25, P75)
Bone alkaline phosphatase (µg/l)	29.6 (20.7, 41.9)
PINP (µg/l)	255.3 (161.2, 486.6)
β-CTX (ng/ml)	1.8 (1.3, 2.5)
iPTH (pg/ml)	205 (116.5, 386.1)
Bio-PTH (pg/ml)	119.5 (76.2, 240)

Variable	
25OH-vitamin D (ng/dl)	22.9 (12.7, 34.2)
Creatinine (mg/dl)	7.6 (5.6, 9.1)
Alkaline Phosphatase (U/l)	111 (89, 145)
Triglicéridos (mg/dl)	146 (102, 193)
C reactive protein (mg/dl)	0.6 (0.25, 1.97)
ProBNP (pg/ml)	8325 (3422, 17450)
FGF-23 (RU/ml)	788 (384, 3258)

Table 2 shows Spearman's correlation coefficients and the corresponding p values of the studied correlations between levels of 25(OH)D and the rest of analyzed parameters. The results show a positive correlation with the parameters related with the degree of anemia of these patients. Hemoglobin $p < 0.032$, hematocrit $p < 0.051$, iron $p < 0.003$, iron saturation index $p < 0.002$, and ferritin $p < 0.047$, as well as with creatinine $p < 0.044$, calcium $p < 0.020$, phosphorous $p < 0.041$ (negative correlation) and albumin $p < 0.041$, without correlation with the other analyzed parameters. Especially important is the fact that the correlations between levels of 25(OH)D and hemoglobin, hematocrit, iron, iron saturation index, and ferritin are quite independent between them. The Spearman's correlation coefficient between the values of hemoglobin and those of PCR of this group of patients was also examined, though no significant correlations were found (coefficient 0.143, $p < 0.080$).

Table 2. Spearman's correlation coefficient and p values between levels of 25(OH)Vitamin D and the parameters of the table.

Variable	N	Coef.	p Value
Age	145	0.061	0.463
Bone Alkaline Phosphatase	145	0.135	0.106
PINP	145	0.025	0.769
CTX	145	0.032	0.703
iPTH	145	-0.032	0.703
Bio-PTH	145	-0.033	0.694
Hemoglobin	145	0.179	0.032
Hematocrit	145	0.163	0.051
Urea	145	0.122	0.144
Creatinine	145	0.168	0.044
Total protein	145	0.047	0.575
Albumin	145	0.17	0.041
Iron	145	0.249	0.003
Iron saturation index	145	0.253	0.002
Calcium	145	0.193	0.020
Phosphorous	145	-0.17	0.041
Total alkaline phosphatase	145	0.06	0.473
Serum CO ₂	143	-0.122	0.146
Cholesterol	145	0.15	0.071
Triglicéridos	145	0.018	0.826
C-reactive protein	142	-0.053	0.535
Prealbumin	114	0.092	0.33
Ferritin	145	0.165	0.047
ProBNP	143	-0.007	0.929
Tweak	145	0.107	0.199
FGF23	145	-0.016	0.848
Years in hemodialysis	141	0.216	0.010
Hidroferol	58	0.191	0.151
Rocaltrol	17	0.334	0.191
Paricalcitol	38	-0.104	0.534
Cinacalcet	24	0.236	0.266
Calcium chelants	54	0.102	0.463

4. Discussion

The results of this study carried out in hemodialysis patients show a strong, independent correlation between the levels of 25(OH)D and levels of hemoglobin, hematocrit, iron, iron saturation index, and ferritin. In other words, there exists a close relationship between the values of 25(OH)D and the degree of anemia of these patients that is not mediated by the levels of iron or ferritin, and it is a direct and independent correlation. As expected, a correlation between the levels of calcium (positive) and phosphorous (negative) and the levels of 25(OH)D in patients with CKD was also found, due to the role of 25(OH)D in the metabolism of calcium and phosphorous. The correlation with albumin was also expected due to the relationship between levels of 25(OH)D and the nutritional state of the patients.

Values corresponding to 145 patients in hemodialysis, 65.9 \pm 14.6 years, 74 males and 71 females and a mean time in hemodialysis of 3 years. Anemia is one of the main complications of the final stages of hemodialysis [8]. Anemia can lead to other comorbidities such as an increase of vascular complications and a decrease in quality of life and an increase of mortality. For this reason, knowledge of the mechanisms that can lead to anemia in these patients is of great interest.

Erythropoietin (EPO) is the treatment of choice for anemia, and it must be administered to practically all patients during the final stages of chronic renal disease. However, these patients often develop a gradual lack of sensitivity to EPO administration, making dose increase necessary to maintain the desired levels of hemoglobin.

Different mechanisms that lead to the lack of response EPO have been suggested, such as iron deficiency, vitamin B₁₂ deficiency, primary hyperparathyroidism, chronic inflammation, and cancer, but none of them fully explains this fact. In recent years, several works have suggested that vitamin D deficiency could be one of the risk factors involved in the lack of response to EPO [4, 9, 10].

In a work published in 2015, Naini et al [11] administered 50 000 UI of vitamin D/week/12 weeks to 32 patients with hemoglobin < 11 g/dl in end-stage hemodialysis. Another 32 patients were untreated. Mean hemoglobin levels were maintained between 9.91 and 10.14 g/dl in the control group and between 9.93 and 11.1 g/dl in the intervention group. A comparison between the required doses of EPO in the two groups showed a decrease in the treatment group ($p < 0.001$).

Similarly, in a 4-month study Kumar et al [12] treated 81 hemodialysis patients who had levels of 25(OH)D between 10 and 30 ng/ml with ergocalciferol (50 000 UI \times 4). Patients with levels < 10 ng/ml received 50 000UI \times 6. Mean levels of these patients were 15.3 \pm 10 ng/ml and were increased to 28.5 \pm 8.6 ng/ml after ergocalciferol. Mean baseline dose of EPO was 21 933 U/month and decreased to 18 400 U/month after treatment. Due to this fact, these authors recommended a more aggressive supplementation with ergocalciferol to reach levels of 25(OH)D higher than 30 ng/ml.

Kiss et al [8] analyzed data from 142 patients in

hemodialysis. As in the present work, they found an independent and significant correlation between levels of 25(OH)D and hemoglobin and also an inverse correlation with the dose level of EPO required to maintain hemoglobin levels.

According to the results of this work, Patel et al [13] studied 1661 patients with renal disease. Levels of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D of these patients were independently correlated with decreased levels of hemoglobin and anemia.

Rianthavorn et al [14] demonstrated that the administration of ergocalciferol + 1, 25 (OH)₂D₃ reduced the doses of EPO necessary to treat children with CKD in stage 5.

Riccio et al [15] also demonstrated that paricalcitol exhibited beneficial effects on hemoglobin levels in patients with advanced-stage CKD, independently of other factors such as inflammation or PTH levels.

These results and those of other authors seem to demonstrate that vitamin D levels are associated with anemia, but the exact mechanism that causes this is unknown. Many of the studies that relate vitamin D deficiency and degree of renal anemia point to a prevalent role of inflammation [16]. VDR activations inhibit the expression of inflammatory cytokines of stroma and increase the release of IL10, exerting anti-inflammatory activity and proliferative effects on erythroid progenitors. In patients with renal disease, vitamin D deficiency can stimulate to immune cells in the microenvironment of the bone marrow, to produce cytokines, causing a fall in erythropoiesis [17]. Kendrick et al [18] studied 16 301 patients in the "National Health and Nutrition Examination Survey: NHANES III", observing that decreased levels of 25(OH)D and high of PCR were independently associated with low hemoglobin concentrations in patients with renal disease who did not require dialysis. In this study, a correlation between 25(OH)D levels and PCR was not found, a fact that seems to rule out the possibility that an increase of inflammation had produced anemia in our patients. On the other hand, the possible correlation between PCR and levels of hemoglobin was studied, and though a significant correlation was not found, the results nearly showed correlation ($p < 0.088$), a fact that could indicate that inflammation could affect anemia, though in a way that is independent of vitamin D.

In the last phase of erythropoiesis, EPO is the main stimulus of erythroid maturation, and the lack of this hormone is the most prevalent cause of anemia in renal insufficiency [19]. Recent studies suggest that vitamin D plays an important role in the synthesis of EPO [13].

Another possible mechanism of anemia is that vitamin D directly stimulates erythroid precursors. A great number of VDR have been discovered in many non-renal tissues, including bone marrow [20, 21]. Normalization of levels of vitamin D in these tissues can provoke an adequate amount of substrate for the extra-renal hydroxylases, and these high concentrations of 1, 25 (OH)₂D in hematopoietic tissues could directly activate precursor erythroid cells [22]. There are authors who postulate that the administration of 25(OH)D is more advantageous for improving anemia in patients with

renal insufficiency than 1.25(OH)₂D administration; this is achieved by administering substrate to the bone marrow to synthesize 1. 25 (OH)₂D in an autocrine or paracrine way [23].

With respect to the mechanism behind the decrease in EPO activity in the case of vitamin D, this deficiency could also be related to the production of proinflammatory cytokines that stimulate the synthesis of hepcidin. Hepcidin, a small polypeptide produced and liberated by the liver, is a mediator in the absorption and utilization of iron. Excessive hepcidin production contributes to the fact that there is not available iron for erythroid precursors and therefore to the development of anemia, although there is a sufficient quantity of EPO [24].

Some authors also point to an important role of PTH hypersecretion in renal anemia, which would have direct effects on endogenous EPO synthesis, bone marrow progenitors, and red cell survival [25]. The beneficial effects of vitamin D in controlling PTH hypersecretion could produce an improvement in the anemia of renal patients [25]. In our work, however, a correlation between 25(OH)₂D and PTH levels was not found, either with intact- or bio-PTH. Other authors suggest that the beneficial effect of vitamin D on anemia in renal patients is independent of PTH suppression [16].

5. Conclusions

In conclusion, levels of 25(OH)₂D are closely related, and seem to condition the degree of anemia of patients with chronic renal disease. As anemia is one of the main complications in the end stages of hemodialysis, it is of great importance to measure and maintain 25(OH)₂D levels in patients with renal failure in end stages, because this fact may reduce the anemia levels and the levels of EPO necessary to maintain hematocrit levels.

Acknowledgements.- This work has been supported by Roche España. We thank Maribel Villarino (Roche) for her kind help throughout the study.

References

- [1] Rojas Rivera J, De la Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2850-2865.
- [2] Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. Calcifediol levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1629-1637.
- [3] Clayton P, Singer R. 25-Hydroxyvitamin D levels in prevalent Australian dialysis patients. *Nephrology* 2009; 14: 554-559.
- [4] Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
- [5] Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell* 1999; 96: 507-15.
- [6] Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009; 113: S1-S130.
- [7] Dusso A, Tokumoto M. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79: 715-729.
- [8] Kiss Z, Ambrus C, Almási C, Berta K, Deak G, Horonyi P, Kiss I, Lakatos P, Marton A, Molnar MZ, Nemeth Z, Szabo A, Mucsi I. Serum 25(OH)-cholecalciferol concentration is associated with hemoglobin level and erythropoietin resistance in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron Clin Prac* 2011; 117: c373-c378.
- [9] Ertürk S, Kutlaci S, Karabulut HG, Keven K, Nergizoglu G, Ates K, Bokesoy I, Duman N. The impact of vitamin D receptor genotype on the management of anemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 816-823.
- [10] Blair D, Byham-Gray L, Lewis E, McCaffrey S. Prevalence of vitamin D deficiency and effects of supplementation with ergocalciferol in stage 5 chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr* 2008; 18: 375-382.
- [11] Naimi AE, Hedayati ZP, Gholami D, Pezeshki AH, Moinezhadeh F. The effect of vitamin D administration on treatment of anemia in end-stage renal disease patients with vitamin D deficiency on hemodialysis: a placebo-controlled double-blind clinical trial. *J Res Med Sci* 2015; 20: 745-750.
- [12] Kumar VA, Kujubu DA, Sim JJ, Rasgon SA, Yang PS. Vitamin D supplementation and recombinant human erythropoietin utilization in vitamin D-deficient hemodialysis patients. *J Nephrol* 2011; 24: 98-115.
- [13] Patel NM, Gutierrez OM, Andress DL, Coyne DW, Levin A, Wolf M. Vitamin D deficiency and anemia in early chronic kidney disease. *Kidney International* 2010; 77: 715-720.
- [14] Rianthavorn P, Boonyapapong P. Ergocalciferol decreases erythropoietin resistance in children with chronic kidney disease stage 5. *Pediatr Nephrol* 2013; 28: 1261-1266.
- [15] Riccio E, Sabbatini M, Bruzzese D, Capuano I, Migliaccio S, Andreucci M et al. Effect of paricalcitol vs calcitriol on hemoglobin levels in chronic kidney disease patients: a randomized trial. *PLoS One* 2015; 10: e0118174.
- [16] Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, Mazzaferro S, Ruso R, Cozzolino M. Renal anemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 1672-1679.
- [17] Davis SL, Littlewood TJ. The investigation and treatment of secondary anemia. *Blood Rev* 2012; 26: 65-71.
- [18] Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-hydroxyvitamin D deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2009; 30: 64-72.
- [19] Nagaku M, Eckardt KU. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 2006; 26: 261-268.
- [20] Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980-991.

- [21] Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 5542-5548.
- [22] Sim J, Lac PT, Liu ILA, Megerditchian SO, Kumar V, Kujubu DA, Rasgon SA. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 2010; 89: 447-452.
- [23] Lac PT, Choi K, Liu IA, Megerditchian S, Rasgon SA, Sim JJ. The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. *Clinical Nephrology* 2010; 74: 25-32.
- [24] Babit JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 2010; 55: 726-741.
- [25] Brancaccio D, Cozzolino M, Gallieni M. Hyperparathyroidism and anemia in uremic subjects: a combined therapeutic approach. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: S21-S24.

PENDIENTE DE ACEPTACIÓN EN OBESITY SURGERY

Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in Morbid

Obesity Before and After Bariatric Surgery

Elena López-Ramiro¹, Mercedes Rubert¹, Peter W. Vorwald², Miguel Górgolas⁴,
Ignacio Mahillo³, Concepción de la Piedra¹

¹ Biochemistry Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación

Jiménez Díaz, Madrid, Spain

² Esophagogastric Surgery Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación

Jiménez Díaz, Madrid, Spain

³ Internal Medicine, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz,
Madrid, Spain

⁴ Epidemiology and Statistics, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación

Jiménez Díaz, Madrid, Spain

Elena López-Ramiro

elenylla@gmail.com

Mercedes Rubert

Merche.rubert@gmail.com

Peter V. Vorwald

PWVorwald@quironsalud.es

Miguel Górgolas

MGorgolas@fjd.es

Ignacio Mahillo

IMahillo@fjd.es

Concepción de la Piedra

cpiedra@fjd.es

Shortened title: Low vit D and high PTH in obesity

Conflict of Interest: None of the authors have a commercial association that might be a conflict of interest in relation with this article.

Correspondence:

Concepción de la Piedra

¹ Biochemistry Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación

Jiménez Díaz, Madrid, Spain

e-mail: cpiedra@fjd.es

Phone: (+34) 649 21 41 73114

Abstract

Background Obese individuals show low vitamin D and high parathyroid hormone (PTH) values. The aim of the present work was to examine changes in body mass index (BMI), vitamin D, and PTH in morbidly obese patients before and after Roux-en-Y gastric bypass.

Methods Eighty-eight patients, 65 women and 23 male, aged 45.48 ± 10.60 years were studied. BMI, 25(OH) Vitamin D (25(OH)D), and PTH were measured before and one year after bariatric surgery. Calcium, phosphorous, hemoglobin, hematocrit, iron, ferritin, transferrin, and alkaline phosphatase were also determined.

Results BMI changed from 43.64 ± 5.77 to 31.99 ± 4.89 kg/m² one year after surgery. Seventy-four patients presented values of 25(OH)D < 24 ng/ml and 31 patients PTH levels >70 pg/ml before surgery, may be because many of them were not treated with vitamin D. One year after surgery, there was an increase ($p < 0.01$) in the levels of 25(OH)D, due to all patients were taking 25(OH)D and the effects of surgery. However, 44 patients presented levels of 25(OH)D <24 ng/ml and 22 continued with PTH levels >70 pg/ml. Before the intervention, levels of 25(OH)D only correlated with PTH levels ($p < 0.42$). After surgery, levels of PTH showed a correlation with PTH and hematocrit.

Conclusions. Many patients with low levels of 25(OH)D were untreated before bariatric surgery. PTH values were elevated in many patients, possibly due to their deficiency in vitamin D. After surgery, these patients improved by surgery and treatment with 25(OH)D. Determining the vitamin-D status of obese patients before and after bariatric surgery may prove greatly beneficial, eliminating many comorbidities.

Keywords: vitamin D; secondary hyperparathyroidism; gastric bypass; morbid obesity

Introduction

Overweight and obesity are defined as the abnormal or excessive accumulation of fat that can be harmful to one's health.

Body mass index (BMI), a simple indicator of the relationship between weight and height. It is calculated by dividing weight in kg by the square of the height in m (kg/m^2). The WHO defines overweight and obesity in these terms: 1) overweight $\text{BMI} \geq 25$, 2) obesity $\text{BMI} \geq 30$, and 3) morbid obesity $\text{BMI} \geq 40$.

Obesity is an increasing worldwide health problem, and is significantly associated with morbidity and mortality (1, 2).

The global obesity epidemic is associated with many conditions of concern to public health, including low vitamin D levels. It is well documented that obese individuals exhibit low vitamin D levels (3, 4), leading to many potential health consequences due the association between low vitamin D levels and risk of hypertension, metabolic syndrome, and certain malignancies (5). As obese individuals are at risk for these comorbidities, deeper understanding of the causes and potential solutions to the problem of the low vitamin D levels is necessary in this population. It has also been shown that high PTH levels are associated with low vitamin D in obese patients (6).

Thanks to their effectiveness in achieving therapeutic endpoints for the comorbidities associated with obesity, bariatric surgical procedures are experiencing increasing success (7). However, by producing mechanical restriction and/or malabsorption syndrome, the technique leads to nutritional deficiencies, including a lack of vitamin D.

Many studies have demonstrated vitamin D deficit in obese patients and in patients with morbid obesity. However, few studies have compared vitamin D levels before and after surgery, correlating these levels with values of PTH and BMI.

The aim of the present study was to examine changes in BMI, vitamin D, and PTH in morbidly obese patients before and after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass.

Subjects and Methods

Patients

The digestive surgery department of our hospital performed 180 bariatric surgeries between 2010 and 2015. In this study, we included information from these interventions recorded in the database if the patient had at least one laboratory test before and another test in the year following surgery which included PTH and 25 (OH) Vitamin D (25(OH)D), weight, and height. Based on these criteria, 88 patients were included, comprising 65 women (73.8%) and 23 men (26.13%), with an age of 45.48 ± 10.60 years (23–65 years), median 45 years, $p_{25}=38$ years and $p_{75}=55$ years. Laparoscopic Roux-en-Y was performed in all patients with level gastric pouch of approximately 75 ml and alimentary limb of 150 cm.

Methods

BMI was calculated by dividing the weight of a patient in kg by the square of their height in m (kg/m^2). Levels of 25(OH)D were measured with an ADVIA CENTAUR (Siemens) autoanalyzer. The inter- and intra-assay coefficients of variation (CV) of the method were <4.2% and <11.9%, respectively, and its

sensitivity was 4.2 ng/ml. PTH determination was made by electrochemiluminescence in an ADVIA CENTAUR (Siemens) autoanalyzer. The reference range provided by the manufacturer was 14–70 pg/ml, with those higher than 70 pg/ml considered abnormal. The inter- and intra-assay CV of the method were <7% and <10%, respectively and its sensitivity was 5 pg/ml. Hemoglobin and hematocrit measurements were performed using an ADVIA 120 (Siemens). Hemoglobin was calculated through a modified cyanmethemoglobin method that colorimetrically measures the absorbance in a flux cuvette at 546 nm. Hematocrit was calculated mathematically: erythrocytes \times mean corpuscular volume / 10. Transferrin was determined by turbidimetric immunoassay in an ADVIA 2400 autoanalyzer. The inter- and intra-assay coefficients of variation (CV) of the method were <1.1 % and <1.8%, respectively, and its sensitivity was 0.01 mg/dl. We used the ADVIA CENTAUR 2400 autoanalyzer to determine a number of parameters. Serum calcium (arsenazo III technique), intra- and inter-assay CV were <1.2% and <2%, respectively. The sensitivity of the method was 0.5 mg/dl. Serum inorganic phosphate (phosphomolybdate UV technique) intra- and inter-assay CV were <2.2% and <3%, respectively. The sensitivity of the method was 0.3 mg/dl. Iron was determined by colorimetry (ferric iron is dissociated from its transporter protein and is reduced to ferrous form. This forms a complex with ferrocine, producing a chromophore). Intra- and inter-assay CV were <2.5% and <2.9%, respectively. The sensitivity of the method was 2 μ g/dl. Ferritin (turbidimetric technique with latex for added potency), intra- and inter-assay CV were <4% and <5%, respectively. The sensitivity of the method was 6.0 ng/ml. Serum alkaline phosphatase (p-nitrophenol hydrolysis) intra- and inter-assay CV were

<1.9% and <2.4%, respectively. The sensitivity of the method was 5 U/l.

Statistical analysis

A descriptive analysis of the parameters used in the study was performed. This study was performed before and one year after bariatric surgery. Parameters were expressed as arithmetic mean \pm standard deviation. Values of 25(OH)D were also expressed as percentages. Spearman's correlation coefficients between 25(OH)D and the rest of the parameters were calculated before bariatric surgery and one year after surgery. The statistical analyses were performed with the STATA 11.0 program. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows patient characteristics at baseline, i.e. before bariatric surgery, and Table 2 displays the characteristics of patients one year after bariatric surgery. The main differences between these two tables are values of BMI, which decreased significantly ($p < 0.001$) as was expected; additionally, 25(OH)D values increased significantly ($p < 0.01$) and PTH values decreased significantly ($p < 0.05$) after the intervention. Table 3 shows the percentage of patients with different values of 25 (OH)D before the intervention, and Table 4 displays this same percentage one year after bariatric surgery. As can be observed, before the intervention, 74 patients (84%) presented 25(OH)D values ≤ 24 ng/ml despite the fact that 34 of these patients were taking 25(OH)D at doses between 4000UI and 16000UI/week. It is important to note that the other 40 patients were untreated and that only 8% of the patients presented levels of 25(OH)D higher than 30 ng/ml. Thus, most patients were severely vitamin-D

deficient prior to surgery. One year after bariatric surgery, there was a considerable change in the values of 25(OH)D, with a significant increase ($p < 0.01$). The main reason for this was likely that after surgery all patients were taking 25(OH)D at least in a dose of 4000 UI/week. Despite this, 44 patients (50%) presented values of 25(OH)D ≤ 24 ng/ml and only 34 of our 88 patients showed values of 25(OH)D > 30 ng/ml.

Regarding the increase in PTH levels seen in a substantial percentage of patients before surgery, 33 had PTH values > 70 pg/ml. It is important to note that the 25(OH)D levels in 31 of these 33 patients were < 24 ng/ml. If we analyze the group of 74 patients with levels of 25(OH)D < 24 ng/ml, we find that 31 (41.9%) presented values of PTH > 70 pg/ml. One year after bariatric surgery, 22 of the patients with high levels of PTH continued to have values > 70 pg/ml, and 14 of these patients presented values of 25(OH)D < 24 ng/ml.

Table 5 shows that presurgical levels of 25(OH)D were only correlated with PTH levels ($p < 0.042$), with no other correlation found with other parameters. However, after surgery, 25(OH)D levels showed a more acute correlation with levels of PTH ($p < 0.006$) and a correlation with hematocrit nearing statistical significance ($p < 0.06$).

Discussion

In the present study, 74 patients with morbid obesity (88.2%) presented values of 25(OH)D < 24 ng/ml before bariatric surgery. Previous authors described that obesity is associated with a deficiency of vitamin D (6, 8-12), and recent meta-analyses show that the prevalence of vitamin D deficiency is different between obese and control groups (3,4).

It must be taken into account that 25(OH)D is the better parameter when assessing the state and vitamin reserve of an individual, although 1,25(OH)₂ vitamin D is the active metabolite of vitamin D (13). This is because levels of 1,25(OH)₂ vitamin D are very well preserved, with a fine regulation that only fails in renal insufficiency or in very specific disorders. For this reason, the measure of serum levels of 25(OH)D is the parameter universally accepted to evaluate the state of vitamin D of the organism (5).

The causes of vitamin D deficiency in obesity involve a number of factors. One is a sedentary lifestyle, with low exposure to solar radiation and scant outside activity (14). However, one of the most important factors may be linked to the sequestration (storage) of this fat-soluble vitamin in adipose tissue (15). According to an alternative hypothesis, the low levels of 25(OH)D in obese persons are the result of a volumetric dilution of vitamin D in large fat deposits. Additionally, when administered to obese patients, vitamin D has less impact on their serum than in non-obese individuals because the vitamin D is accumulated in adipose tissue (16). Authors such as Poddar et al (8) suggest that patients with obesity require much higher doses than the age-matched population, and recommended administering 2 to 3 times the quantity of vitamin D required by general population in order to achieve similar levels of vitamin D (17). In addition, a decrease in hepatic production of 25 (OH)D due to hepatic steatosis and a decrease in the synthesis of vitamin D through the skin may also play a role (18,19).

Another interesting point is that the catecholamine and natriuretic peptide lipolytic assistance in both obese patients (20) and insulin-resistant adipocytes (21) may lead to a reduced release of vitamin D from adipose tissue. However,

the mechanisms controlling the deposition and release of vitamin D from adipose tissue are still unknown (22). As vitamin D is a fat-soluble secosteroid, it is subjected to the same pathway of catecholamine-induced lipolysis observed for cholesterol. Moreover, human adipocytes express vitamin D-metabolizing enzymes (23), suggesting that in obese individuals, adipose tissue not only accumulates vitamin D passively, but also changes its metabolism.

In a recent work, Di Nisio et al (16) hypothesized that the fat-solubility of vitamin D suggests a sequestration process in body fat depots, though in obesity the release of vitamin D mediated by lipolysis is altered together with an enzymatic manipulation changed. These authors observed a substantial decrease in the lipolytic release of vitamin D stimulated by adrenaline in fat explants of obese males, which can be explained by a decrease in β -adrenergic receptor.

Chakhtoura et al (24) analyzed 51 observation studies assessing 25(OH)D status pre- and/or post-bariatric surgery, producing findings that agree with ours. Mean pre-surgery 25(OH)D levels were below 30 ng/ml in 29 studies, and 17 of those studies showed mean 25(OH)D levels \leq 20 ng/ml. Here, we have found a mean presurgical level of 25(OH)D = 16.9 ng/ml in the included patients.

Obesity is also associated with secondary hyperparathyroidism (6). This anomaly can be secondary to vitamin D deficiency, as we have recently demonstrated (25). In this previous work, we found a cut-point of 24 ng/ml of 25(OH)D, representing the vitamin D level below which the probability of experiencing a secondary hyperparathyroidism increases significantly. In the present work, 31 of 74 patients with levels of 25(OH)D lower than 24 ng/ml

presented PTH values above 70 pg/ml (high range of normality), that is, 49.5% of the patients had 25(OH)D <24 ng/ml. This percentage is similar to the one we found in the general population that present secondary hyperparathyroidism associated to levels of 25(OH)D < 24 ng/ml in our publication before mentioned (25). The correlation between low levels of vitamin D and high levels of PTH in our patients is supported by the significant correlation that we have found between PTH and 25 (OH)D before surgery ($p<0.042$).

Although hyperparathyroidism in obese patients may be secondary to vitamin D deficiency, an independent association of vitamin D between PTH and obesity has been reported. Some researchers have suggested that a mechanism of impaired calcium homeostasis in obesity may explain the high levels of PTH. Hultin et al (26) have highlighted a shift to the left of the calcium/PTH curve in patients with morbid obesity in a lowered threshold of the “set point” calcium for PTH response given.

In the present work, after bariatric surgery, we found an increase in the levels of 25(OH)D, one of the causes being that treatment with 25 (OH)D was universal, with patients receiving minimum doses of 4000 UI/week of 25(OH)D. Other causes for this increase in 25(OH)D levels could be produced by the surgery, that produces a decrease in fat deposits in patients after bariatric surgery, and a the decrease in hepatic steatosis after intervention among other effects. Despite this, in our work, 44 patients (50% of the total) continued presenting levels of 25 (OH)D <24 ng/ml. Obispo Entrenas et al (10), in their study of a population with morbid obesity, found that 77% of the total presented vitamin D deficiency before surgery (in our work we found an 84% of patients with values of 25(OH)D<24ng/ml), and only 18% had normalized values

postsurgically (in our case a 34% more of patients with respect the situation before surgery reach values $>24\text{ng/ml}$).

Peterson et al (7) reviewed the relevant literature on the status of vitamin D before and after bariatric surgery, and they found that the prevalence of hypovitaminosis remained similar after surgery and was higher if the surgical procedure was the Roux-en-Y gastric bypass. Chakhtoura et al (24) studied the vitamin D status after bariatric surgery in 51 observational research papers and found that the mean levels of 25(OH)D remained below 30 ng/l after bariatric surgery in spite of different supplementation regimes, with very few exceptions. The increase in 25(OH)D levels tends to relate with the administered dose of vitamin D, though it varies greatly between studies. An increase of 9 to 13 ng/ml was obtained when doses of vitamin D of 1100 to 7100 UI/day were used. These authors did not observe differences between levels of vitamin D based on the surgical technique employed.

Lespesailles et al (15) reviewed the main causes determining vitamin D deficiency in patients after bariatric surgery. These were the following: 1) the initial vitamin D deficiency prior to any surgical procedure in obese patients; 2) bile-salt deficiency associated with bariatric surgery procedures (the absorption of vitamin D requires the presence of bile salts); 3) inadequate vitamin D supplementation after surgery; and 4) malabsorption of vitamin D sometimes due to intestinal bacterial overgrowth problems (27).

In the present work, in spite of the decrease of patients with secondary hyperparathyroidism after surgery, 22 patients continued to have a PTH value $>70\text{ pg/ml}$, and 14 patients maintained levels of 25(OH)D $<24\text{ ng/ml}$, a fact that could justify PTH value. However, in our group of patients, the number of

subjects with high levels of PTH decreases after surgery, possibly because many of the patients normalize their vitamin D levels. After bariatric surgery, we found a closer correlation between PTH and 25(OH)D levels (p values changed from 0.042 to 0.006 before and after surgery). Another highly interesting point is the observed correlation between levels of hematocrit and 25(OH)D in these patients after surgery. In a recent work by our group (28) we found a close correlation between levels of 25 (OH)D and the degree of anemia of patients with chronic renal disease.

Switzer et al (29) carried out a systematic review of the bibliography to determine whether secondary hyperparathyroidism was maintained over the medium and long term in patients following Roux-en-Y gastric bypass. They reviewed 14 works that included 2680 women in total, and concluded that PTH levels rose gradually over 5 years and levels of 25(OH)D fell gradually to 20.5 ± 4 ng/ml and 20.7 ± 3.8 ng/ml at intervals of 2 to 5 years and after 5 years post-surgery. These results contradict ours, as we found general improvement in these parameters.

The association between obesity and vitamin D deficiency is beyond doubt. However, in a work by Peterson et al (30) studying 265 patients candidates for bariatric surgery, levels of 25(OH)D of many patients were not evaluated, thus creating a high risk for these patients, as they were untreated. In our work, 25(OH)D levels were only measured in 88 of 180 patients undering surgery in the digestive surgery department over the last five years, and a large proportion was untreated.

It is important to take into account that as a consequence of obesity, chronic inflammation through the activation of signalling pathways could lead to

the promotion of pro-inflammatory cytokines (31). Conversely, vitamin D has been recognized for its anti-inflammatory benefit in various immune cell types (31). Since vitamin D deficiency is also associated with chronic inflammation, obese individuals with vitamin D deficiency have an extraordinary risk of adverse surgical outcomes, particularly delayed wound healing and infection due to the role of vitamin D in re-epithelialization and innate immunity. Thus, determining the vitamin D status of bariatric-surgery candidates and addressing this issue preoperatively may prove greatly beneficial and lifelong (32). This statement could be also applied to all obese patients. It is generally accepted that a level of 30 ng/ml might be achieved.

An added problem is that there is no general consensus about the appropriate treatment with vitamin D in obese patients. Chakhtoura et al (33) recently reviewed several clinical practice guidelines to assess recommendations on dose and time of treatment with vitamin D in the pre- and post-bariatric surgery. These authors conclude that current recommendations on vitamin D supplementation in bariatric surgery differ between societies. They do not meet the criteria for optimal guideline development, possibly due in part to limited resources. Thus, there is a pressing need for high-quality randomized trials to inform clinical guidelines.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: None of the authors has a commercial association that might be a conflict of interest in relation with this article.

Authors' Contributions

The authors' responsibilities were as follows: The project idea come from MR and CP. ELR, MR, PW, MG, and CP designed the research. ELR, MR, PW, and MG conducted the research. ELR and IM analyzed the data and performed statistical analysis. CP had prime responsibility for the final manuscript content. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Must A, Spadano J, Coakley EH et al. The disease burden associated with overweight and obesity. JAMA 1999; 282(16): 1523-9.
2. Ng M, Fleming T, Robinson M et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study2013. Lancet 2014; 384(9945): 766-81.
3. Yao Y, Zhu L, He I, Duan Y, Liang W, Nie Z et al. A metaanalysis of the relationship between vitamin D deficiency and obesity. Int J Clin Exp Med 2015; 8(9): 14977-84.
4. Pereira Santos M, Costa PR, Santos CA, Santos DB, Assis AM. Obesity and vitamin D deficiency: Is there an association? Obes Rev 2016; 17(5): 484.
5. Rojas –Rivera J, De la Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The spanning spectrum of biological actions of vitamin D. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(9): 2850-65.
6. Lotito A, Teramoto M, Cheung M, Becker K, Sukumar D. Serum parathyroid hormone responses to vitamin D supplementation in overweight/obese adults: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Nutrients 2017; 9(3): pii:E241.
7. Peterson LA, Zeng X, Caufield-Noll CP, Schweitzer MA, Magnuson TH, Steele KE. Vitamin D status and supplementation before and after bariatric surgery: a comprehensive literature review. Surg Obes Relat Dis 2016; 12(3): 693-702.
8. Poddar M, Chetty Y, Chetty VT. How does obesity affect the endocrine system?. A narrative review. Clin Obes 2017; 7(3): 136-144.

- 9.-Savastano S, Barrea L, Savanelli MC, Nappi F, Di Somma C, Orio F, Colao A. Low vitamin D status and obesity: role of nutritionist. *Rev Endocr Metab Disord* 2017; 18(2): 215-25.
- 10.-Obispo Entrenas A, Legupin Tubio D, Lucena Navarro F, Martin Carvajal F, Gandara Adan N, Redondo Bautista M, Abiles Osinaga J. Relationship between vitamin d deficiency and the components of metabolic syndrome in patients with morbid obesity, before and 1 year after laparoscopic Roux-en-Y-gastric bypass or sleeve gastrectomy. *Obes Surg* 2017; 27(5): 1222-8.
- 11.- Durá-Travé T, Gallinas-Victoriano F, Chueca-Guindulain MJ, Berrade-Zubiri S. Prevalence of hipovitaminosis D and associated factors in obese Spanish Children. *Nutr Diabetes* 2017; 13:7(3): e248.
- 12.-Rontoyani VG, Aila JC, Kaul S, Wong R, Veeranki SP. Association between obesity and serum 25(OH)D concentrations in older Mexican adults. *Nutrients* 2017;9(2): pii E97.
- 13.- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol* 2005; 298(1): F8–F28
- 14.-Hypönen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45Y: Nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(3): 860-8.
- 15.- Lespessailles E, Tuomi H. Vitamin d alteration associated with obesity and bariatric surgery. *Experimental Biol Med* 2017; 242(10): 1086-1094.
- 16.-Di Nisio A, De Toni L, Savobic I, Rocca MT, De Filippis V, Opocher G et al. Impaired release of vitamin d in dysfunctional adipose tissue: new question vitamin D supplementation in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2017: doi: 10.1210/jc.2016-3591. [Epub ahead of print].
- 17.-Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari Ha et al. Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911- 30.
- 18.- Stein EM, Strain G, Sinha N, Ortiz D, Pomp A,Dakin G et al. Vitamin d insufficiency prior to bariatric surgery: risk factors and a pilot treatment study. *Clin Endocrinol* 2009; 71(2): 176-83.
- 19.- Williams SE, Cooper K, Richmond , Schauer P. Perioperative management of bariatric surgery patients. Focus on metabolic bone disease. *Cleve Clin J Med* 2008; 75(5): 333-49.

- 20.- Ryden M, Backdahl J, Petrus P, Thorell A, Gao H, Coue M et al. Impaired atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis in obesity. *Int J Obes* 2016; 40(4): 714-20.
- 21.-Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY. Insulin disrupts beta-adrenergic signaling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 2005; 437(7058): 569-73.
- 22.- Abbas MA. Physiological functions of vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 165(Pt B): 369-81.
- 23.- Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signaling in adipose tissue. *Br J Nutr* 2012; 108(11):1915-23.
- 24.-Chakhtoura MT, Nakhoul NN, Shawwa K, Antzoros C, El Haij Fuleihan GA. Hypovitaminosis D in bariatric surgery: a systematic review of observational studies. *Metabolism* 2016; 65(4): 574-85.
- 25.- López-Ramiro E, Rubert M, Mahillo I, De la Piedra C. Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2016; 8(2): 55-60.
- 26.- Hultin H, Edfeldt K, Sundborn M, Hellman P. Left-shifted relation between calcium and parathyroid hormone in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(8): 3973-81.
- 27.- Koch TR, Finelli FC. Postoperative metabolic and nutritional complications of bariatric surgery. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39(1):109-24.
- 28.- López-Ramiro E, Rubert M, González-Parra E, Mahillo I, De la Piedra C. Correlation between levels of 25-hydroxy-vitamin D and degree of anemia in patients with chronic kidney disease. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2017; 5(4): 145-150.
- 29.-Switzer NJ, Marcil G, Prasad S, Debru E, Church N, Mitchell P et al. Long-term hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism outcomes of the Roux-EN-Y-gastric bypass: a systematic review. *Obes Rev* 2017; 18(5): 560-566.
- 30.- Peterson LA, Cheskin LJ, Schweitzer MA, Magnuson TH, Steele KE. Treatment for vitamin D deficiency prior to bariatric surgery: a prospective cohort study. *Obes Surg* 2016; 26(5): 1146-9.
- 31.- Pannu PK, Calton EK, Soares MJ. Calcium and vitamin D in obesity and related chronic disease. *Adv Food Nutr Res* 2016; 77: 57-100.

32.-Peterson LA. Bariatric surgery and VitaminD: key messages for surgeons and clinicians before and after bariatric surgery. *Minerva Chir* 2016; 71(5): 322-36.

33.- Chakhtoura MT, Nakhoul NN, Aki EA, Mantzoros CS, El Haij Fuleihan GA. Guidelines on vitamin d replacement in bariatric surgery: identification and systematic appraisal. *Metabolism* 2016; 65(4): 586-97.

Table 1. Patient characteristics at baseline, prior to intervention (bariatric surgery)

Variable	N	Mean	DS	Median	P25	P75
Age (years)	88	45.48	10.60	45.00	38.00	55.00
Weight (kg)	88	117.55	19.69	116.00	105.50	126.50
Height (cm)	88	163.98	9.62	161.50	157.00	170.00
BMI (kg/m ²)	88	43.64	5.77	43.00	40.00	47.50
25(OH) vitD	88	16.88	7.84	16.08	11.67	19.43
PTH (pg/ml)	88	65.29	32.28	59.75	43.00	84.15
Calcium (mg/dl)	85	9.18	0.65	9.20	9.00	9.50
Phosphorous (mg/dl)	82	3.29	0.50	3.30	2.90	3.60
Hemoglobin (g/dl)	83	13.94	1.45	13.80	13.10	15.00
Hematocrit (%)	83	42.04	4.13	42.30	39.50	45.10
Iron (µg/dl)	77	67.99	29.85	66.00	49.00	83.00
Ferritin (ng/dl)	79	82.07	84.36	54.00	28.00	107.00
Transferrin (mg/dl)	72	269.46	49.02	261.00	240.50	302.00
Alkaline phosphatase (UI/l)	12	80.00	28.25	74.50	60.00	90.50

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48±10.60 years (23–65 years).

Table 2. Patient characteristics one year after bariatric surgery (Roux-en-Y)

Variable	N	Mean	DS	Median	P25	P75
BMI (kg/m ²)	88	31.99	12.71	25.79	20.17	35.29
25(OH) vitD	88	28.44	7.84	16.08	11.67	19.43
PTH (pg/ml)	88	57.98	27.65	50.05	40.50	70.60
Calcium (mg/dl)	85	9.24	0.36	9.21	9.00	9.50
Phosphorous (mg/dl)	82	3.73	0.49	3.75	3.30	4.10
Hemoglobin (g/dl)	83	13.51	1.29	13.45	12.60	14.40
Hematocrit (%)	83	41.01	3.96	40.60	38.15	43.45
Iron (µg/dl)	77	83.86	31.26	81.00	58.00	109.00
Ferritin (ng/dl)	79	57.91	66.53	39.50	14.00	74.00
Transferrin (mg/dl)	72	274.51	58.17	266.50	240.00	302.00
Alkaline phosphatase (UI/l)	12	81.69	28.22	80.00	63.00	87.00

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48±10.60 years (23–65 years).

Table 3. Number (n) and percentage of patients with different values of 25(OH) vitamin D before intervention (bariatric surgery).

<u>25(OH) Vitamin D</u>	<u>n</u>	<u>%</u>
< 10 ng/ml	14	16%
10-24 ng/ml	60	68%
>24-30 ng/ml	7	8%
>30 ng/ml	7	8%

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48 ± 10.60 years (23–65 years).

Table 4. Number (n) and percentage of patients with different values of 25(OH) vitamin D one year after bariatric surgery (Roux-en-Y).

<u>25(OH) Vitamin D</u>	<u>n</u>	<u>%</u>
< 10 ng/ml	4	5%
10-24 ng/ml	40	45%
>24-30 ng/ml	10	11%
>30 ng/ml	34	39%

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48 ± 10.60 years (23–65 years).

Table 5. Spearman's correlation coefficient and p values between levels of 25(OH) vitamin D and the parameters of the table in patients with morbid obesity before bariatric surgery.

BMI	88	0.02	0.818
PTH	88	-0.22	0.042
Calcium	85	0.03	0.813
Phosphorous	82	0.02	0.83
Hemoglobin	83	-0.14	0.205
Hematocrit	83	-0.13	0.244
Iron	77	0.09	0.443
Ferritin	79	-0.13	0.249
Transferrin	72	-0.16	0.182
Alkaline Phosphatase	12	0.01	0.983

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48 ± 10.60 years (23–65 years).

Table 6. Spearman's correlation coefficient and p values between levels of 25(OH) vitamin D and the parameters of the table in patients with morbid obesity one year after bariatric surgery (Roux-en-Y).

BMI	88	-0.04	0.770
PTH	88	-0.29	0.006
Calcium	88	0.16	0.127
Phosphorous	84	0.10	0.349
Hemoglobin	88	0.24	0.022
Hematocrit	88	0.20	0.062
Iron	81	0.10	0.443
Ferritin	82	-0.13	0.249
Transferrin	80	-0.16	0.182
Alkaline Phosphatase	13	0.35	0.234

Eighty-eight patients with morbid obesity were included in this study, comprising 65 women and 23 men, aged 45.48 ± 10.60 years (23–65 years).

